

Aus der II. Medizinischen Klinik und Poliklinik der
Freien Universität Berlin im Städt. Krankenhaus Westend
Ehemaliger Direktor: Professor Dr. med. Gotthard Schettler

IN VITRO UND IN VIVO-UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE
LIPOPROTEIDLIPASEAKTIVIERUNG NACH SUBLINGUALER UND
RECTALER VERABREICHUNG VON SAUREM NATRIUMHEPARIN
BEIM MENSCHEN

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an der

Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Wolfgang Bergemann

aus Berlin

1968

Aus der II. Medizinischen Klinik und Poliklinik der Freien
Universität Berlin im Städt. Krankenhaus Westend

Ehemaliger Direktor:

Professor Dr. med. Gotthard S c h e t t l e r

In vitro und in vivo-Untersuchungen über die Lipoproteid-
lipaseaktivierung nach sublingualer und rectaler Verab-
reichung von saurem Natriumheparin beim Menschen.

Inaugural - Dissertation
zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der

Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Wolfgang Bergemann
aus Berlin

Dekan: Professor Dr. med. Hans Wolfgang S p i e r
Referent: Professor Dr. med. Gotthard S c h e t t l e r
Korreferent: Priv.-Doz.Dr.med.Dipl.-Chem.

Franz v. B r u c h h a u s e n



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 26.9.1968

1. Einleitung

2. Die Entwicklung der

2.1. Die Entwicklung

2.2. Die Entwicklung

2.3. Die Entwicklung

2.4. Die Entwicklung

2.5. Die Entwicklung

2.6. Die Entwicklung

2.7. Die Entwicklung

2.8. Die Entwicklung

2.9. Die Entwicklung

2.10. Die Entwicklung

2.11. Die Entwicklung

Gewidmet

meinen Eltern

und

meiner Frau

3. Die Entwicklung der

3.1. Die Entwicklung

3.2. Die Entwicklung

3.3. Die Entwicklung

3.4. Die Entwicklung

3.5. Die Entwicklung

3.6. Die Entwicklung

3.7. Die Entwicklung

3.8. Die Entwicklung

3.9. Die Entwicklung

4. Die Entwicklung der

5. Die Entwicklung der

6. Die Entwicklung der

Inhaltsverzeichnis

1. Einführung
2. Die Klärungsreaktion
 - 2.1. Das Substrat
 - 2.2. Das Heparin
 - 2.3. Der Klärfaktor
 - 2.3.1. Endogener Klärfaktor
 - 2.3.2. Herkunft des Klärfaktors
 - 2.3.3. Der Abbau des Klärfaktors
 - 2.3.4. Eigenschaften des Klärfaktors
 - 2.4. Die Klärung
 - 2.4.1. Die Bedeutung des Heparins
 - 2.4.2. Beteiligung von Proteinen
 - 2.4.3. Die Triglyzeridspaltung
3. Pathologie des Klärmechanismus
4. Therapie mit Heparin
5. Eigene Untersuchungen
 - 5.1. Fragestellung
 - 5.1.1. Zu prüfende Substanz
 - 5.2. Methodik
 - 5.2.1. Reagenzien
 - 5.2.2. Durchführung der Kläraktivitätsbestimmungen
 - 5.2.3. Probanden
 - 5.2.4. Auswertung
 - 5.3. Ergebnisse
6. Diskussion
7. Zusammenfassung
8. Tabellen

1. Einführung

Im Jahre 1943 unternahm HAHN Isotopenversuche an Kaninchen zur Bestimmung der zirkulierenden Erythrozytenzahl. Dabei entdeckte er zufällig, daß die bei den unregelmäßigen Fütterungen auftretende, starke lipämische Trübung der Kontrollblutproben in den weiteren Blutproben solcher Tiere verschwand, denen Heparin als Antikoagulans gemeinsam mit den markierten Erythrozyten infundiert worden war. Diese "geklärten" Blutproben waren etwa 3-5 Minuten nach der Erythrozyten-Heparin-Infusion entnommen worden. Auch heparinisiertes Gesamtblut oder Plasma sowie in physiologischer Kochsalzlösung gelöstes Heparin hatten auf die nach verschiedenen Fettmahlzeiten auftretende Lipämie den gleichen Einfluß. Einem lipämischen Serum in vitro zugesetztes Heparin zeigte dagegen keinen Effekt. WELD (1944) bestätigte diese Befunde an Hunden, Katzen, Kaninchen und auch am Menschen. Diese Beobachtungen lösten eine große Zahl von Untersuchungen aus. Die dabei erhaltenen Ergebnisse haben neben den speziellen Erkenntnissen über ein im Fettstoffwechsel wirksames Ferment auch interessante Einsichten in den physiologischen und pathologischen Fettstoffwechsel erbracht (SCHÖLL und SCHETTLER 1961).

1950 gelang ANDERSON und FAWCETT der entscheidende nächste Schritt: Sie fanden, daß Serum von Menschen, welches einige Minuten nach einer intravenösen Heparin-gabe gewonnen worden war (sogenanntes Postheparinserum) lipämisches Serum in vitro klärt. Als wirksamen Faktor vermuteten sie die Bildung eines oberflächenaktiven Heparin-Phosphatidkomplexes. GRAHAM und Mitarbeiter (1951) postulierten daraufhin, daß Plasma nach Heparinverabreichung ein an ultrazentrifugierbare Globuline gebundenes "aktives Prinzip" enthalte. LINDGREN, FREEMAN und GRAHAM (1952) bemerkten am Boden von Ultrazentrifugenröhrchen, in denen vorher eine "Klärung" alimentär-lipämischen Serums mit Postheparinserum abgelaufen war, einen Calciumoleat-

niederschlag und vermuteten als erste eine hydrolytische Spaltung von Triglyceriden zu freien Fettsäuren und Glycerin. NICHOLS, FREEMAN, SHORE und RUBIN (1952) konnten dann eine Freisetzung von Fettsäuren durch Titration nachweisen, und SHORE, NICHOLS und FREEMAN (1953) gaben als Quelle der freien oder unveresterten Fettsäuren ebenfalls die Triglyceride an, deren Konzentration sich parallel zur Zunahme der freien Fettsäuren verringert. KORN (1954) bewies, daß der "aktive Faktor" eine Lipase ist, die sich von der Pankreaslipase sowie anderen Lipasen auf Grund typischer Eigenschaften unterscheiden läßt. Er nannte dieses Enzym "Lipoproteidlipase". GROSSMAN und Mitarbeiter beschrieben 1955, daß die in vitro-Kläraktivität von Postheparinserum quantitativ dessen lipolytischer Aktivität entspricht, und daß dementsprechend die Klärung eines lipämischen Serums direkt proportional zum Freiwerden von freien Fettsäuren und damit Folge der Triglyceridhydrolyse ist.

2. Die Klärungsreaktion

Im folgenden sollen die zum Klärmechanismus gehörenden Einzelfaktoren, sowie dieser selbst an Hand der Literatur geschildert werden, um Einsicht in die Fragestellung der vorliegenden Arbeit zu gewinnen.

2.1. Das Substrat

Das mit der Nahrung aufgenommene Fett, das überwiegend Triglyceride darstellt, wird nach FRAZER (1936) auf verschiedene Weise resorbiert. Nach der durch die Pankreaslipase bewirkten Spaltung der Triglyceride zu Glycerin und freien Fettsäuren und der Resorption der Spaltprodukte erfolgt in den Dünndarmepithelien eine Resynthese zu Triglyceriden, welche dann über das Pfortadersystem der Leber zugeleitet werden. Oder die Neutralfette werden unhydrolysiert oder nur bis zu den Monoglyceriden abgebaut,

als solche absorbiert und dann durch die Lymphe über den Ductus thoracicus als Chylomikronen abtransportiert. Von den Darmzellen soll rund 60% des Fettes in Form von Chylomikronen ins Blut gelangen (LEUTHARDT 1957). Diese Fettröpfchen von 0,5 bis 1 μ Durchmesser bilden das Substrat der während einer alimentären Lipämie in vivo ablaufenden Klärungsreaktion. Sie erhielten ihren Namen wegen ihrer Herkunft und Größe (GAGE und FISH 1924). Erstmals wurden sie als die mit bloßem Auge sichtbare Trübung lipämischer Seren von HEWSON (1774) entdeckt. Die Chylomikronen treten vermehrt postcenaal im Blut auf, wenn die Neutralfettkonzentration die Löslichkeitsgrenze von ca. 20 Milliäquivalent veresterte Fettsäuren pro Liter Serum übersteigt (ALBRINK 1955). Sie stellen eine wesentliche Transportform der Serumfette dar und bedingen etwa 60 - 75% des Neutralfettanstiegs nach einer Mahlzeit (GAGE und FISH 1924, SWANG und WILMOT 1951). Das optisch klare Nüchternserum gesunder Menschen enthält bis zu 3 Mill. Chylomikronen/mm³ (SCHETTLER 1961). Die Chylomikronen bestehen in ihrem Lipidanteil nach SWANK und WILMOT (1951) zu ca. 97% aus Neutralfetten und ca. 3% aus Cholesterin, nach JOBST (1955) aus etwa 86% Neutralfett, 6% Phosphatiden, 3% Cholesterin und 5% Cholesterinestern. Sie sind negativ geladen (FRAZER und STEWART 1936). Bei pathologischen Hyperlipämien enthalten die Chylomikronen weniger Neutralfett (55%), aber mehr Phosphatide (12%), Cholesterin (6%) und Cholesterinester (27%) (JOBST 1955). Bei längerem Stehen lipämischer Seren rahmen die Chylomikronen an der Oberfläche auf. Nach Ultrazentrifugierung finden sie sich in den Lipoproteidklassen S_f 70 - S_f 40.000 (SCHÖLL und SCHETTLER 1961, FREDRICKSON 1957). In der freien Elektrophorese wandern sie im α_2 -Globulinbereich (SCHETTLER und Mitarbeiter 1955). Die Chylomikronen kann man im Dunkelfeld mikroskopisch bestimmen (GAGE und FISH 1922). JOBST (1955) standardisierte die Zählbedingungen und bestimmte die Chylomikronenzahl

pro mm³ Serum. Einfach ist die nephelometrische Bestimmung, d.h. der Vergleich der optischen Dichte verschiedener Lösungen.

Die Klärung des Plasmas beschränkt sich nur auf die Triglyceride, Cholesterin und Phosphatide werden durch die Lipoproteidlipase nicht angegriffen (SHORE, NICHOLS, FREEMAN 1953, ZÜLLNER, FRINGS 1956 u.a.). Triglyceridhaltig sind aber auch die in der freien Elektrophorese als β -Lipoproteide charakterisierten Fraktionen, die nach GOFMAN die Lipoproteidklassen S_f 0-10, 10-20 und bis S_f 400 darstellen. Diese Lipoproteide werden ebenfalls hydrolysiert, da nach Ablauf der Klärung alle S_f -Klassen über 10 aus dem Serum verschwunden sind (GRAHAM und Mitarbeiter 1951, KORN 1955 II). Von den α -Lipoproteiden, die einen sehr geringen Triglyceridgehalt haben, ist nicht bekannt, ob sie durch Triglyceridaufnahme ein geeignetes Substrat werden könnten (SCHÖLL und SCHETTLER 1961). Mehrfach wurde versucht, ein künstliches Substrat herzustellen. KORN (1955 II) gelang es, durch Einwirkung von α_1 -Lipoprotein auf Cocosnußöl einen geeigneten Lipid-Protein-Komplex herzustellen.

2.2. Das Heparin

Der wichtigste, die Lipolyse des Substrats im Blutserum auslösende Faktor ist das Heparin. Heparin ist der Sammelname für Schwefelsäureester von Amino-Zuckern und ist mit der Chondroitinschwefelsäure eng verwandt (HAUSCHILD 1960). Es gehört zu der Gruppe der Mucopolysaccharide. Die Struktur des Heparins ist noch nicht vollständig geklärt. Es besteht aus Glucuronsäure und Glucosamin, enthält aber pro Struktureinheit mehrere Moleküle Schwefelsäure (LEUTHARDT 1957). Ein Teil der Schwefelsäureester soll sulfonamidartig an die Aminogruppen des Glucosamins (α -Heparin) bzw. an Galactosamin (β -Heparin) gebunden sein. Nach FOSTER und HUGGARD (1955) setzt sich das

Heparinmolekül aus ungefähr 25 Glucuronsäuren und 75 daran gebundenen Sulfatresten zusammen.

Für die gerinnungshemmende Aktivität des Heparins spielt u.a. das Ausmaß der Sulfatierung eine Rolle, wobei die größte Wirkung auftreten soll, wenn auf 2 Zuckermoleküle 3 Schwefelsäuregruppen entfallen (HAUSCHILD 1960). Die Sulfatgruppen, die in dem großen Molekül dicht beieinander liegen, führen zu einer hohen örtlichen Ladungsdichte, die möglicherweise viele charakteristische Eigenschaften des Heparins bedingt (SCHÖLL und SCHETTLER 1961).

Auch der Polymerisationsgrad ist ausschlaggebend. Das Molekulargewicht des Heparins beträgt etwa 15000 - 20000. Heparin reagiert stark sauer. Im Blutplasma ist das Heparin an einen spezifischen Eiweißkörper (Heparinkomplement) gebunden (LEUTHARDT 1957). Die Wirkung des Heparins kann man durch Protamin und Toluidinblau, beides basische Amine, aufheben (BRAGDON und HAVEL 1954). Heparin wurde von MC LEAN 1916 in Leber- und Lungengewebe als gerinnungshemmender Stoff entdeckt. Es wird auch heute noch aus Lungen von Schlachttieren gewonnen. Histologisch bzw. histochemisch findet man Heparin neben Histamin in den Granula von Mastzellen und Basophilen. Die Mastzellen enthalten wesentlich mehr als die Basophilen; 20 - 60 μg Heparin pro 10^6 Zellen werden für erstere angegeben. (BRAUNSTEINER und THUMB 1963). In den unreifen Zellen liegt als Vorstufe ein Heparinmonoschwefelsäureester vor. Mit fortschreitender Sulfurierung nimmt die Metachromasie sowie die gerinnungshemmende Aktivität zu (BRAUNSTEINER und THUMB 1963). Bei Histaminausschüttung, die mit einer Auflösung der Granula einhergeht, soll Heparin nicht freigesetzt werden. Sein Freisetzungsmechanismus ist bisher nicht völlig bekannt (BRAUNSTEINER und THUMB 1963). Wegen ihrer diffusen Verteilung ist die Anzahl der Mastzellen beim Menschen nicht bekannt, sie soll aber höher liegen als die der Basophilen. Die Zahl der letzteren soll ca. 150 Mill. Zellen im strömenden Blut betragen,

die ca. 500 µg Heparin enthalten (BRAUNSTEINER und THUMB 1963). Diese Menge würde für einen nachweisbaren Kläreffekt ausreichend sein. Vermindert sind die Basophilen bei Hyperthyreose, Morbus Cushing, nach ACTH- oder Cortisongabe, bei schwerem Stress und in der Schwangerschaft, vermehrt bei Myxödem und Diabetes mellitus (BRAUNSTEINER und Mitarbeiter 1959). Nach Verabreichung hoher Dosen Depot-Heparin soll sich die Zahl der Basophilen ebenfalls vermindern. SHELLEY und JUHLIN (1961) berichten, daß nach einer hochgradigen Fettbelastung die Blutbasophilen vermehrt sind bei meist teilweiser Entgranulierung als Zeichen der Heparinausschüttung. SANDHOFER und Mitarbeiter (1962) stellten deshalb die Hypothese auf, daß eine enge Beziehung zwischen der Zahl der Basophilen-Granula und der Konzentration der Blutfette bestehe und der vermehrten postcenenalen Heparinfreisetzung aus Basophilen mit entsprechender Lipoproteidlipase-Aktivierung physiologische Bedeutung zukomme. Bei Arteriosklerose fanden BRAUNSTEINER und THUMB (1963) keinen anomalen Befund. Es bestand auch keine Alters- und Geschlechtsabhängigkeit. Da die Bestimmung der Mastzellen beim Menschen schwieriger ist, wurde von BRAUNSTEINER und THUMB (1963) eine Zählung im Rattenknochenmark vorgenommen. Hier konnte eine Mastzellenverminderung außer nach histaminfreisetzenden Substanzen bei der Antigen-Antikörperreaktion, nach Cortison- und Protamingaben, nach intraperitonealer Fettinfusion sowie nach wochenlangem, fettreicher Nahrung beobachtet werden (FODOR und Mitarbeiter 1962). CONSTANTINIDES (1953) fiel auf, daß bei Ratten in fast allen Organen außer im Gehirn viele Mastzellen vorhanden sind. Kaninchen dagegen zeigen weniger oder überhaupt keine Mastzellen. Bei Kaninchen läßt sich durch Cholesterinfütterung leicht eine Arteriosklerose erzeugen, bei Ratten dagegen so gut wie nie. CAIRNS und CONSTANTINIDES veröffentlichten 1954 eine Arbeit über die Zählung von Mastzellen im Herzen von

Jugendlichen sowie Frauen und Männern hohen Alters. Jugendliche und Alte ohne Arteriosklerose besaßen gleiche Mastzellenzahl. Bei weiblichen Jugendlichen wurden mehr Mastzellen als bei männlichen Personen gleichen Alters gefunden. Frauen mit Arteriosklerose zeigten eine signifikant verringerte Mastzellenzahl.

Die Menge des im Blutserums vorhandenen Heparins ist schwer bestimmbar. NIKKILA und MAJANEN (1952) untersuchten die Protamin-Bindungs-Kapazität des Blutes, die sie bei Arteriosklerotikern niedriger als bei Normalen fanden, desgleichen auch bei Alteren gegenüber Jüngeren. Beim Patienten mit frischem Myokardinfarkt waren dagegen die Protamintiterwerte normal oder erhöht trotz der Arteriosklerose. Zum gleichen Ergebnis kam ENGELBERG (1954). Er fand, daß sich die S_f 12 - 100-Lipoproteide dabei umgekehrt proportional zu den Heparinwerten verhielten, S_f 0 - 12 signifikant unterschiedlich, S_f 12 - 400 nicht signifikant verschieden seien (ENGELBERG 1954, 1955). Er zog daraus den Schluß, daß eine ungenügende Heparin-Produktion ätiologisch in Beziehung stünde zu den Fettstoffwechselstörungen, die eine Entwicklung der Arteriosklerose bedingen. (ENGELBERG 1954, 1955). FREEMANN, ENGELBERG und DUDLEY (1954) verwendeten eine Bestimmungsmethode, die auf der antikoagulatorischen Aktivität beruht und fanden an Hand dieser Eigenschaft, daß die normalerweise im menschlichen Blut vorhandene Substanz mit Heparin identisch oder aber sehr ähnlich sei und wahrscheinlich proteingebundenes Heparin darstellt. Diese Substanz lag in größerer Menge vor, als bis dahin angenommen worden war. ANTONINI und SALVINI (1957) geben als Mittelwerte der Heparin-Konzentration im Blutserum folgende Werte an: bei normalen 40 - 70-jährigen Männern 300 $\mu\text{g} \%$, bei arteriosklerotischen 40-70-jährigen Männern 130 $\mu\text{g} \%$ und bei Männern von 40-100 Jahren 200 $\mu\text{g} \%$. Der Unterschied zwischen Normalen und Arteriosklerotikern erwies sich als signifikant. ENGELBERG (1960) fand bei einem Gesunden Heparin-

Plasmawerte von 10-24 E % (1,0 - 2,4 mg pro Liter Plasma) an. Bei den durchschnittlichen Werten fand er zwischen Jungen und Alten nur kleine Variationen und keinen Unterschied zwischen Männern und Frauen. Bei Ultrazentrifugensanalysen fand der Autor keine signifikante Abhängigkeit zwischen den Heparinwerten und den S_f 0-12 Lipoproteiden bei beiden Geschlechtern. Die S_f 12-400 Lipoproteide dagegen sind signifikant erniedrigt bei Männern wie bei Frauen, wenn das Heparin erhöht ist, so daß der Autor zu dem Schluß gelangte, daß Heparin ein Regulator unter anderem der Serumlipide ist.

Die Wirkung des Heparins auf den Fettstoffwechsel ist nicht an das Gesamt-molekül gebunden. ZÖLLNER, ROTHEMUND und SEITZ (1954) wiesen nach, daß durch Abbau des Heparins eine Teilsubstanz entsteht, welche die volle antilipämische Wirkung, aber nur eine minimale gerinnungshemmende Wirkung besitzt. Antilipämische Wirkung besitzen auch Stoffe, die dem Heparin nahe verwandt sind, oder aber einen anderen chemischen Aufbau aufweisen. Zu diesen gehören zum Beispiel Chondroitinsulfat B (GORE und LARKING 1959), partiell depolymerisierte Hyaluronsäure, Hyaluronidase und Desoxycorticosteron. CAPRARO und Mitarbeiter (1956) fanden im Magensaft von verschiedenen Tieren ein resorbierbares, saures Aminopolysaccharid mit antilipämischen Eigenschaften. BIANCHINI (1958) isolierte ein kläraktives Heparinoid aus der Magenschleimhaut, aus der Duodenalschleimhaut des Schweines. Auch Stärke, Glykogen und Cellulose können in hoher Dosierung einen Kläreffekt hervorrufen (LEVY 1958). Nicht körpereigene, kläraktive Substanzen stellen die zur Thromboseprophylaxe in Gebrauch befindlichen Heparinoide (zum Beispiel Thrombocid, Eleparon, Dextran-sulfat) dar. Auch anorganische Substanzen können eine Klärung lipämischen Serums herbeiführen, wie HAVEL und BRAGDON (1954) mit Natriumpoly-metaphosphat zeigten. Diese Substanz hat auch eine antikoagulatorische Wirkung und stellt ein negativ geladenes Polyelektro-

lyt mit relativ hohem Molekulargewicht dar.

Deshalb wird vermutet, daß die Freisetzung des im Gewebe gebundenen Klärfaktors durch Heparin und ähnlich wirkende Stoffe an eine starke, elektrostatische Oberflächenaktivität gebunden ist (SCHOLL und SCHETTLER 1961).

2.3. Der Klärfaktor

Heparin und andere Substanzen sind imstande, die durch Triglyceride bedingte Trübung eines lipämischen Serums durch Freisetzung bzw. Aktivierung von Klärfaktor bzw. Lipoproteidlipase aufzuheben bzw. zu verringern.

ANDERSON und FAWCETT wiesen 1950 nach intravenöser Heparin-gabe im Postheparinserum eine lipämieklärende Substanz nach, deren Natur als ein oberflächenaktiver Heparin-Phosphatid-Komplex angesehen wurde. Einen indirekten Nachweis lieferte BROWN (1953), der fand, daß intravenös verabreichtes Protamin die alimentäre Hyperlipämie verstärkt und verlängert. BRAGDON und HAVEL (1954) erreichten den gleichen Effekt mit Toluidinblau und konnten dabei gleichzeitig einen Abfall der freien Fettsäuren sowie einen Anstieg der Triglyceride feststellen.

2.3.1. Endogener Klärfaktor

Ein indirekter Nachweis endogener, d.h. ohne Auslöser-substanz vorhandener Kläraktivität gelangen NIKKILÄ und MAJANEN (1953). In einem Euglobulinpräzipitat menschlichen Serums konnten sie kläraktive Substanz anreichern. JEFFRIES (1954) fand bei nüchternen Ratten nur gelegentlich eine geringe Kläraktivität, eine deutliche aber nach Olivenölgabe. ENGELBERG (1954) ging bei seinen Untersuchungen von dem Gedanken aus, daß sich die Heparinwerte im Plasma umgekehrt proportional zur Menge der Serumlipoproteide verhalten müßten, man also bei Individuen mit niedriger Serumlipoproteidkonzentration am ehesten endogenen Klärfaktor nachweisen könne. Dies gelang ihm

bei Jugendlichen, jungen Frauen und teilweise bei älteren Männern und Frauen mit sehr niedrigen Serumlipoidwerten. Die gefundenen Klärfaktormengen entsprachen etwa denjenigen, die durch eine intramuskuläre Injektion von 25 mg Heparin aktiviert werden. In einer weiteren Arbeit fand ENGELBERG (1958) bei 112 von 482 Getesteten (23%) endogenen Klärfaktor, wobei sich keine Alters- oder Geschlechtsunterschiede feststellen ließen. Bei über 80jährigen allerdings konnte er in der Mehrzahl Klärfaktor nachweisen. ROBINSON und Mitarbeiter (1955) konnten auch nach Unterbindung des Ductus thoracicus bei Ratten, also bei Fehlen von Chylomikronen im Blut, endogenen Klärfaktor nachweisen. GATES und GORDON (1958) dagegen konnten im Serum von 7 nüchternen Versuchspersonen nach Inkubation mit Cocosnußöl allein bei 37°C über 3 Stunden signifikant mehr freie Fettsäuren finden als bei gleicher Inkubation mit Protaminzusatz. Nach ihren Angaben enthält eine Plasmamenge von 3,5 l die zur Hydrolyse von 0,02 g Fett erforderliche Kläraktivität. Sie sprechen daher der im Serum vorhandenen endogenen Lipoproteidlipase eine geringe Bedeutung für den Fettstoffwechsel zu. BRAUNSTEINER, SAILER und SANDHOFER (1961) gelang mittels einer manometrischen Methodik der eindeutige Nachweis einer lipolytischen Spontanaktivität bei Ratten. Diese war nach 48stündigem Hunger der Versuchstiere signifikant niedriger als bei normal ernährten Tieren. Beim Menschen fanden diese Autoren weder nüchtern noch nach Fettbelastung eine sichere lipolytische Aktivität. Dies war offenbar durch die relative Unempfindlichkeit der Methodik bedingt. Mit der empfindlicheren Methode der Titration der freien Fettsäuren nach DOLE und MEINERTZ fanden sich bei nüchternen Versuchspersonen nur in einem Teil der Fälle geringe, deutliche Kläraktivitäten aber nach Einnahme des Mittagessens.

2.3.2. Herkunft des Klärfaktors.

Es erhebt sich nun die Frage nach der Herkunft oder der

Organverteilung des Klärfaktors. WELD (1944) fand an Hand von Differenzen bei Trübungsmessungen während Durchströmungsversuchen an Katzen mit lipämischem, heparinversetztem Blut in den Hinterextremitäten und der Leber, bei Tieren bei denen die gesamte Blutzufuhr zur Leber verhindert oder die Aorta cranialis abgeklemmt worden war, sowie bei decerebrierten Katzen Kläraktivität im Blutserum. ANFINSEN, BOYLE und BROWN (1952) konnten bei beschränkten Durchströmungsversuchen an Ratten und Hunden mit heparinisiertem Plasma in den abdominalen und thorakalen Regionen ebenfalls hohe Kläraktivitätswerte, insbesondere in Herz und Lunge demonstrieren. JEFFRIS (1954) dagegen fand bei isolierter Durchströmung der Leber von Ratten keine Kläraktivität.

Im Schock wird, wie in dem Absatz über Heparin geschildert, dieses aus Mastzellen bzw. Basophilen ausgeschüttet. Es ist schon länger bekannt, daß beim Hund im durch Peptoninjektionen erzeugten anaphylaktischen Schock das Blut ungerinnbar wird. HAVEL und BOYLE (1954) wiesen dabei eine stark erhöhte Kläraktivität nach, die der nach Heparininjektion nachweisbaren identisch ist. KORN (1954 und 1955 I und II) sowie SZABO und Mitarbeiter (1962) isolierten aus Rattenherzextrakt ohne vorherige Heparinungen ein zellulär gebundenes Enzym mit allen bekannten Eigenschaften des Klärfaktors. Die von KORN (1955) extrahierten Klärfaktormengen genügten nach Meinung dieses Autors zur vollständigen Hydrolyse der alimentären Neutralfette des Serums. 1957 wiesen KORN und QUIGLEY geringe Mengen Klärfaktor im Fettgewebe von Küken nach. Nach der Hypothese von ROBINSON und HARRIS (1959) und ROBINSON (1960) soll der Klärfaktor an der Oberfläche der Gefäßintima vorhanden sein. Im menschlichen Herzmuskel ist die Lipoproteidlipase-Aktivität bei Erwachsenen 10 mal niedriger als bei der erwachsenen Ratte, während bei menschlichen Neugeborenen eine höhere Aktivität als bei Erwachsenen zu finden ist (SAILER und

Mitarbeiter 1963). Der Herzmuskel kann nach diesen Autoren Triglyceride aufnehmen, speichern und bei Kohlehydratmangel mit Hilfe der Lipoproteidlipase-Triglyceridhydrolyse selbständig seinen Energiebedarf durch die Verbrennung von freien Fettsäuren decken. Im menschlichen Fettgewebe fanden BRAUNSTEINER und SAILER (1961) im Gegensatz zu Rattenfettgewebe keine wesentliche lipolytische Aktivität. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu Ergebnissen von KORN (1955 I) sowie CHERKES und GORDON (1953), die bei Heparindurchströmung auffallenderweise die größte Klärfaktormenge im Fettgewebe fanden.

2.3.3. Der Abbau des Klärfaktors

Neben einer im Plasma erfolgenden Inaktivierung (GROSSMAN 1954) findet der hauptsächliche Abbau offenbar in der Leber statt. SPITZER und SPITZER (1956) fanden bei Ratten, deren Leber mit kläraktivem Postheparinserum durchströmt wurde, einen Abfall der Klärrate. Dieses Ergebnis wurde indirekt bestätigt durch KERN (1961), der im Postheparinserum von Patienten mit Lebercirrhose eine schnellere in vitro-Klärung fand, bei allerdings geringerer lipolytischer Aktivität. Es ist darauf hinzuweisen, daß dieser Autor zwei verschiedene Vorgänge unterscheidet, nämlich Klärung und Lipolyse, worauf im Folgenden noch eingegangen werden soll. Ähnliche Beobachtungen stammen von BAKER (1957) und anderen, die bei Patienten mit Lebercirrhose sowie bei Alkoholikern eine erhöhte Kläraktivität im Serum fanden.

2.3.4. Eigenschaften des Klärfaktors

Über die Thermolabilität des Klärfaktors berichten ANFENSEN, BOYLE und BROWN (1952). Sie gaben eine Inaktivierung innerhalb von 3 Minuten bei 60°C an. BASKYS und Mitarbeiter (1962) fanden eine Inaktivierung nach 3 Minuten bei 55°C bzw. zwei Stunden bei 37°C. GROSSMAN (1954) fand einen Aktivitätsverlust von 80% nach einer Stunde

bei 40°C, von 30% nach 6 Stunden bei 25°C. Nach HOLLET und MENG (1956) ist gereinigter Klärfaktor nach 5 Minuten bei 50°C inaktiviert. Nach GROSSMAN (1954) ist der Klärfaktor bei 5°C aufbewahrt 6 Stunden stabil bzw. nach MENG und Mitarbeitern (1954) bei 0 bis 5°C relativ stabil. Gereinigter Klärfaktor kann ohne Aktivitätsverlust im Eisschrank aufbewahrt werden (HOLLET und MENG 1956). Als Trockenpulver behielt der Klärfaktor, über sieben Tage aufbewahrt, seine Aktivität. (BASKYS und Mitarbeiter 1962). Die optimale Klärwirkung liegt nach ANFINSEN und Mitarbeitern (1952) sowie MENG und Mitarbeitern (1954) bei 35 bis 40°C, nach GROSSMAN (1954) bei 20 bis 25°C. Das pH-Optimum beträgt 6,4 bis 7,5 (ANFINSEN und Mitarbeiter 1952, MENG und Mitarbeiter 1954, HOLLET und MENG 1956), für den gereinigten Klärfaktor liegt er bei pH 8,5 (HOLLET und MENG 1956). Der Klärfaktor ist eher säure- als alkaliempfindlich (MENG und Mitarbeiter 1954). Er erträgt Lyophilisation ohne Aktivitätsverlust und ist dialysierbar (ANFINSEN und Mitarbeiter 1952). Bei letzterem Vorgang wird allerdings ein erheblicher Enzymaktivitätsabfall beschrieben (BASKYS und Mitarbeiter 1962). Die Aktivität des Klärfaktors wird durch Polymetaphosphat induziert (KORN 1954) und durch Natrium-Azetat gesteigert. Eine 1-molare Kochsalzlösung hemmt die Klärreaktion irreversibel (KORN 1954, 1955 I). Weiterhin hemmen Protaminsulfat, Toluidinblau, anorganisches Pyrophosphat, ATP, Uridintriphosphat und Adenylsäure die Enzymwirksamkeit (KORN 1955 I). Chymotrypsin, bei 37°C über 2 Stunden wirkend, zerstört das Enzym (ANFINSEN und Mitarbeiter 1952). Nach KÖNIG, SEITZ und ZÖLLNER (1959) kann freies Heparin die Klärreaktion auch hemmen. Der Grad der Hemmung soll dabei von der in vitro zugesetzten Heparinmenge abhängen und auf einem kompetitiven Mechanismus beruhen. Demgegenüber stehen die Befunde von ISELIN und SCHULER (1957), die nach Zugabe größerer Mengen Heparin zu Rinder-, Kaninchen- oder Rattenherzextrakten keine signifikante Hemmung der Klär-

aktivität feststellen konnten. Ein weiteres, charakteristisches Merkmal der Lipoproteidlipase ist deren Inaktivierung durch eine ziemlich spezifische Heparinase (KORN 1956, SPITZER und SPITZER 1956), die aus Kaninchenleber gewonnen werden kann. In der Kälte-Äthanol-Fraktionierung der Plasma-Proteine nach Cohn zeigt die Fraktion III_{1,2,3} die größte Klärfaktor-Aktivität. In der Ultrazentrifuge verhält sich der Klärfaktor wie die Globuline (GRAHAM und Mitarbeiter 1951); in der Stärkeelektrophorese bei pH 7,2 wandert er mit dem Alpha₁-Globulin (SCHÖLL und SCHETTLER 1961). Von BASKYS und Mitarbeiter (1962) wurde der Klärfaktor mit der Ultrazentrifuge in eine Haupt- und zwei Nebenkomponten aufgetrennt. Die Reindarstellung des Klärfaktors gelang bisher noch nicht, wohl aber eine Anreicherung auf das 1480-fache (HOLLET und MENG 1956).

2.4. Die Klärung

2.4.1. Die Bedeutung des Heparins

Eine Kläraktivität läßt sich nach parenteraler Zufuhr von Heparin nachweisen (HAHN 1943 u.a.). In vitro hat zugesetztes Heparin keinerlei lipämieklärende Wirkung (HAHN 1943, WELD 1944, ANDERSON und FAWCETT 1950 u.a.). KORN (1954) vermutet, daß Heparin der Aktivator des fettklärenden Enzyms ist. Ob Heparin den präexistenten, zum Beispiel an der Gefäßintima (ROBINSON und Mitarbeiter 1959, ROBINSON 1960) oder im Fettgewebe (CHERKES und GORDON 1959) elektrostatisch am Gewebe fixierten Klärfaktor freisetzt (ISELIN und SCHULER 1957, CHERKES und GORDON 1959, ROBINSON und Mitarbeiter 1959, ROBINSON 1960), oder ob Heparin ein Bestandteil des Klärfaktors ist, wird diskutiert. Zum Beispiel ist noch unbekannt, ob ein Einbau des Heparins in den Klärfaktor erfolgt (ISELIN und SCHULER 1957). Einige Autoren nehmen einen solchen Einbau an, so ANDERSON und FAWCETT (1950), die als klärwirksames Agens einen oberflächenaktiven Heparin-Phospholipid-Komplex ansehen, desgleichen ANFINSEN (1954),

der vermutet, das Heparin eine prosthetische Gruppe des Klärfaktors ist, ferner KÖNIG, SEITZ und ZOLLNER (1959), sowie ZÖLLNER (1963). SCHÖLL und SCHETTLER (1961) vermuten eine Bindung der Lipoproteidlipase an eine für die Aktivierung der Triglyceride im Lipoproteidmolekül verantwortliche Phospholipoid-Peptid-Gruppierung mit an der Oberfläche wirksamen elektrostatischen Kräften durch ihren heparinartigen Anteil bedingt, der eine hohe negative Ladung aufweist. Damit soll dann die Bindung der Lipoproteidlipase an das Substrat erfolgen. Dafür spräche - nach Meinung der Autoren - auch die Notwendigkeit geringer Mengen zweiwertiger Kationen oder Ammoniumionen zur Reaktion, sowie die Hemmbarkeit durch hohe Salzkonzentrationen sowie durch hoch geladene Polyanionen wie Dextransulfat, Pyrophosphat und das Heparin selbst.

Die zur Freisetzung des Klärfaktors benötigte Heparinmenge und die bis zu seinem Auftreten im Serum verstreichende Zeit wird wie folgt in der Literatur angegeben:

Nach SAILER und Mitarbeitern (1961) genügen 3 I.E. pro kg Körpergewicht, das sind etwa 0,023 mg pro kg Körpergewicht (1 Internationale Einheit entspricht 7,7 Gamma Alpha-Heparin), wobei vier Minuten nach der Injektion die größte Kläraktivität nachweisbar ist, die bis zu einer halben Stunde andauert. Zu ähnlichen Daten kamen GROSSMAN (1952) sowie MENG und DAVIS (1954). Letztere fanden eine maximale Kläraktivität nach Injektion von 0,05 mg Heparin pro kg Körpergewicht nach 3-15 Minuten. Durch Dosen von 0,07 mg pro kg Körpergewicht konnte die Klärfaktoraktivität nicht gesteigert werden. Bei Mengen von 0,1 bis 0,5 mg Heparin pro kg Körpergewicht bestand eine lineare Beziehung zwischen Kläraktivität und Heparinmenge. KRAUPP (1956) beschrieb ebenfalls, daß nach 10 bis 20 µg Heparin pro kg Körpergewicht eine Klärwirkung in 10 bis 20 Minuten nach der Heparingabe entnommenem Plasma nachweisbar ist. Von einer Dosierung von 0,5 bis 1,0 mg pro kg Gewicht erfolgt nurmehr eine Verlängerung der Kläraktivität im Postheparinserum, aber keine weitere

Intensivierung der Klärung (GROSSMAN 1954). EIBER und Mitarbeiter (1961) dagegen fanden erst bei 25 mg intravenös injizierten Heparins eine signifikante Aktivität nach 15 Minuten, die bis zu 3 Stunden andauerte. Nach 50 mg war bis zu 4 Stunden Kläraktivität nachweisbar und nach subcutaner Injektion von 200 mg fast 1 Tag lang. ROBINSON (1960) konnte nach Injektion von Heparin in die Femoralarterie von Kaninchen schon 20 Sekunden später in der Femoralvene lipolytische Aktivität nachweisen. Aus dem sofortigen Auftreten der Lipase schloß er auf deren Freisetzung von einem für das zirkulierende Blut sofort erreichbaren Sitz. Auch ISELIN und SCHULER (1957) konnten bereits nach 30 Sekunden eine Kläraktivität nachweisen. Nach den Angaben von ZÖLLNER (1961) dagegen erfolgt die Lipämieklärung nicht sofort, sondern beginnt erst nach 15-30 Minuten. Seiner Überlegung nach geht nach der Blutentnahme die Klärung in vitro bis zur Messung weiter, so daß man durch Rückextrapolation der linear abfallenden Trübung des Serums auf den Zeitpunkt der Blutentnahme zu der eigentlichen "Lipämieklärungszeit" kommt.

2.4.2.

Zur Klärreaktion gehört, damit die Reaktion nach dem Massenwirkungsgesetz in Richtung der hydrolytischen Aufspaltung als auch umgekehrt ablaufen kann (SCHOLL und SCHETTLER 1961) ein Fettsäuren-Acceptor (KORN 1955 I, ANFENSEN 1954, ROBINSON 1960). Diese Funktionen können verschiedene Proteine erfüllen. Am wirksamsten ist das im Serum vorhandene oder bei künstlich hergestellten Lösungen zugesetzte Albumin. ROBINSON und FRENCH (1953) beschreiben, daß auch die Beta- und Alpha-Lipoproteine im Plasma als freier Fettsäuren-Acceptor wirken können, wenn auch schwächer als Albumin, wobei Beta-Lipoprotein die größte Affinität der beiden zu den freien Fettsäuren hat (SCHOLL und SCHETTLER 1961). Zwischen dem Albumin und den Fettsäuren-Anionen besteht eine starke Affinität. Die Stärke dieser nicht polaren Anziehung wächst mit der

Kettenlänge der Proteine (TERESI und LUCK 1952). Nach DAVIS und DUBOS (1946) kann dabei ein Molekül Albumin 9 Moleküle Fettsäuren binden.

2.4.3. Die Triglyceridspaltung

Von der Lipämiklä rung werden in der Hauptsache die Neutralfette erfaßt. Die Cholesterinester und die Phospholipide werden dagegen kaum bei der Klärung gespalten (ZOLLNER und FRINGS 1956). Die Neutralfette werden nach Heparin-injektion schneller verwertet, indem sie zur Energiegewinnung rascher verbrannt oder in den Fettdepots abgelagert werden. Dieses schnellere Verschwinden aus der Blutbahn kann nach GROSSMAN und STRUB (1954) nicht durch eine erhöhte Aufnahmerate von Leber und Milz erklärt werden, da die Konzentration in diesen Organen nach der Heparin-gabe abfällt.

Zuerst sichtbar wird eine Veränderung der Chylomikronen im Dunkelfeldmikroskop, wo eine starke Zusammenballung derselben zu beobachten ist (SWANK 1961). Die hydrolytische Aufspaltung der Lipoproteide, katalysiert durch den Klärfaktor nach Heparininjektion, vermuteten als erste LINDGREN, FREEMAN und GRAHAM (1952), als sie nach abgelaufener in vitro-Klä rung am Boden von Ultrazentrifugenröhrchen einen Calciumoleatniederschlag fanden. NICHOLS, FREEMAN, SHORE und RUBIN (1952) sowie SHORE, NICHOLS und FREEMAN (1953) wiesen dann als erste eine Zunahme der freien Fettsäuren und einen Abfall der Triglyceridkonzentration nach. MENG und EDGREN (1963) fanden nach intravenöser Verabreichung von Fette-mulsionen und Heparin an Hunde, daß der Plasmagehalt an freien Fettsäuren innerhalb von 30 Minuten um durchschnittlich 33% erhöht sei, nach einer 2. Heparininjektion nach 2 Stunden allerdings nur noch um 14%. ANFENSEN (1954) beschrieb ein Nachhinken der Glyzerin-freisetzung und vermutete, daß der Abbau über die Di- und Monoglyzeride erfolgt. MENG und Mitarbeiter (1954) fanden maximale in vitro-Klä rung von Olivenölsubstraten im Konzentrationsbereich von 0,32 - 0,72 mg pro ml, von Ductus

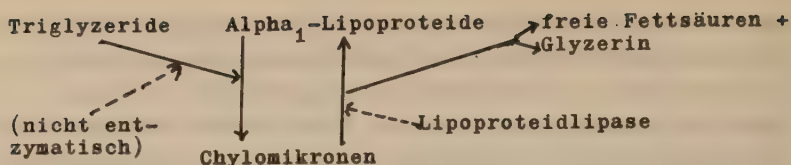
thoracicus-Lymphe bei 0,48 bis 1,0 mg Fett pro ml.

Diese Abhängigkeit von der Substratkonzentration verhält sich nach der Michaelis-Konstante und zeigt keinen Unterschied gegenüber bisher bekannten Lipasen (KRAUPP, SAILER und STUMPF 1956). Das Substratoptimum für die Lipoproteid-lipase mit 1% Serumneutralfett bzw. 1,5% Gesamtesterfett-säurenkonzentration fällt in den für Esterasen üblichen Bereich (EGGSTEIN 1963). Bei optimalen Bedingungen ergibt sich nach EGGSTEIN (1963) eine Relation von Esterabfall zu Glycerinanstieg zu freien Fettsäuren wie drei zu eins zu drei. Derselbe Autor stellte bei der in vivo-Lipolyse im Gegensatz zu der in vitro-Lipolyse fest, daß

1. Glycerin als Reaktionsprodukt im Postheparinserum nicht ansteigt, sondern abfällt,
2. die freien Fettsäuren zwar faßbar, aber nur gering zunehmen,
3. die Neutralfette um 40 - 50% abfallen, und
4. eine zwischen 4-5% schwankende, statistisch gesicherte Cholesterinverminderung erfolgt.

Die hier angeführten von den in vitro-Versuchen abweichenden Ergebnisse erklären sich aus der unterschiedlichen Metabolisierung der Reaktionspartner. Die Plasma-Halbwertszeit von Neutralfetten beträgt 10 - 20 Minuten, die der freien Fettsäuren 1 - 2 Minuten, diejenige des Glycerins soll noch kürzer sein als die der freien Fettsäuren (EGGSTEIN 1963). Diese Stoffwechselvorgänge konnten auch mit Hilfe radioaktiver Isotope verfolgt werden. REISER und Mitarbeiter (1960) konnten mit sowohl Glycerin- als auch Palmitinsäure- markiertem Tripalmitin die Aufspaltung der Triglyzeride in Glycerin und Palmitinsäure nachweisen. BECKER, RALL und GROSSMAN (1955) fanden bei Verwendung einer C^{14} markierten, intravenös verabreichten Sojabohnen-öl-Emulsion bei Ratten einen nach Heparininjektion beschleunigten Abstrom des Fettes aus dem Blut mit einem starken Anstieg von C^{14} in der Kohlensäure der Ausatem-luft. Mit Hilfe markierter Fettsäuren bestätigten HAVEL

und Mitarbeiter (1956), daß die aus Triglyzeriden der Chylomikronen freigesetzten Fettsäuren schnell in der Fraktion der an Albumin gebundenen, nicht veresterten Fettsäuren im Plasma auftreten. Nach FREDRICKSON und Mitarbeitern (1958) dagegen erscheint ein großer Teil der Triglyzeridfettsäuren der Chylomikronen nicht wieder in der Fraktion der unveresterten Fettsäuren des Plasmas. Die vermehrte Fettsäurenverbrennung an Hand der $C^{14}O_2$ Vermehrung in der Ausatemungsluft wurde auch von HAVEL und FREDRICKSON (1956), von VON BRAND, ZÖLLNER und DRESCHER (1959) festgestellt. Die letztgenannten Autoren fanden den größten Teil der Radioaktivität in der Leber, übereinstimmend mit BRAGDON und GORDON (1958), die 10 Minuten nach Heparininjektion dort die größte Aktivität vorfanden. BRAGDON und GORDON (1958) konnten auch ausschließen, daß die C^{14} -Aktivität aus den markierten Chylomikronen in signifikantem Ausmaß in den Alpha- und Beta-Lipoproteiden auftritt. Dieser Befund war der Abschluß eines Weges, der durch die irrtümliche Deutung der Elektrophoreseveränderungen nach Heparininjektion begangen worden war. Da die Alpha- und Beta-Lipoproteide durch Aufnahme freigesetzter unveresteter Fettsäuren ihre Wanderungsgeschwindigkeit erheblich steigern (GORDON 1955) und man im Elektropherogramm nach Heparinigen nicht das Maximum dieser Veränderungen trifft, sondern schwächere Grade, so imponieren sie grob als Abnahme der im Beta-Globulinbereich und als Zunahme der im Alpha-Globulinbereich wandernden Lipoproteide. (nach SCHOLL und SCHETTLER 1961). Frühere Autoren vermuteten deshalb einen Übergang von Beta-Lipoproteiden in Alpha-Lipoproteide (GRAHAM und Mitarbeiter 1951, BOYLE, BRAGDON und BROWN 1952 und andere). KORN (1955 II) hatte aufgrund dieser Ergebnisse einen Kreismechanismus für den Fettransport vorgeschlagen, bei dem die Alpha-Lipoproteide in die Chylomikronen übergehen, wobei er noch eine Einbeziehung der Beta-Lipoproteide in diesem Zyklus vermutete.



GRAHAM und Mitarbeiter (1951), sowie LINDGREN, FREEMAN und GRAHAM (1952) fanden mittels Ultrazentrifugenversuchen eine veränderte Verteilung der niedrigmolekularen Lipoproteide nach Heparininjektion, charakterisiert durch eine Verschiebung der Lipoproteide hoher S_f (S_f 20 bis 40.000) zu Lipoproteiden niedrigerer S_f -Klasse ($S_f < 10$), wobei nach der Gofman'schen S_f -Skala die Lipoproteide $S_f > 70$ den Chylomikronen entsprechen.

Während der Klärreaktion tritt bei der obengenannten Verschiebung eine zwischenzeitliche Erhöhung der S_f 10-20 Lipoproteide auf (GRAHAM und Mitarbeiter 1951). Die Klärreaktion läuft nur bis zu einer Teilchengröße von S_f 6-10 ab (SHORE 1955). Das bedingt aber auch eine Abnahme der Beta-Lipoproteide (SCHÖLL und SCHETTLER 1961). Nach Meinung dieser Autoren gibt es bislang keinen Beweis dafür, daß auch in vivo aus Alpha-Lipoproteiden - wegen ihres geringen Triglyzeridgehaltes allein kein Substrat für den Klärfaktor wie die Beta-Lipoproteide - durch Aufnahme von Triglyzeriden ein geeignetes Substrat entstehen kann.

3. Pathologie des Klärmechanismus

Das Klärsystem kann theoretisch gestört sein durch Veränderungen von Resorption, Serumlipiden, Lipoproteiden, Heparin, Klärfaktor und Klärfaktor-Acceptor. BECKER und Mitarbeiter (1950) stellten verminderte Fettresorption bei älteren Menschen fest. Bei diesen soll die Pankreaslipase signifikant verringert sein und somit mehr ungespaltenes Fett in das Serum gelangen. GOFMAN (1950 I, II, GRAHAM und Mitarbeiter 1951) beobachteten erstmalig, daß die Gruppe der S_f 10-20 und darüberliegenden Lipoproteide,

die "Beta-Lipoproteide niederer Dichte", vermehrt sein kann. Sie fanden eine Vermehrung dieser Lipoproteidfraktion bei Patienten mit Arteriosklerose, Myokardinfarkt, Diabetes mellitus, Hyperthyreose, Hochdruckleiden und Coronarinsuffizienz. Sie vermuteten, daß ein Mangel an körpereigenem Heparin oder dessen Vorstufen die Ursache für diese Fettstoffwechselstörung sei. WOLDOW und Mitarbeiter (1954) beschrieben, daß nach alimentären Fettbelastungen die Lipämie bei Arteriosklerosepatienten im Vergleich zu Normalpersonen ausgeprägter und anhaltender ausfalle. Da Fettbelastungsversuche erhebliche Fehlerquellen haben, divergieren die Literaturangaben. SCHETTLER und JOBST (1955) fanden bei nüchternen, älteren Versuchspersonen im Vergleich zu jüngeren lediglich Unterschiede im Bereich der Neutralfette (gesamtveresterte Fettsäuren), bei Arteriosklerotikern im Vergleich zu entsprechend gesunden Altersgruppen eine Erhöhung des freien und veresterten Cholesterins, der gesamtveresterten Fettsäuren sowie der Chylomikronen. Nach einer alimentären Fettbelastung veränderte sich der Serumgehalt an Cholesterin und an Phospholipoiden in keiner Altersklasse. Die gesamten veresterten Fettsäuren dagegen waren bei Arteriosklerotikern gegenüber jüngeren oder älteren Gesunden erhöht. Die Chylomikronen stiegen bei älteren Gesunden stärker an als bei jüngeren, aber zwischen älteren Gesunden und Arteriosklerotikern des gleichen Alters bestanden keine Unterschiede. Auf der Vorstellung eines Heparin- bzw. Klärfaktormangels bei verschiedenen Formen von Hyperlipämie bzw. Klärungsstörungen fußend, wurden zahlreiche Arbeiten veröffentlicht. Mit Hilfe der Protamintitration wurde nachgewiesen, daß bei Arteriosklerosekranken Heparinsubstanzen vermindert oder nicht nachweisbar sind (NIKKILÄ und MAJANEN 1952). Nach ENGELBERG (1955) soll zwischen dem Blutheparinspiegel und der Konzentration der Lipoproteide niederer Dichte eine umgekehrte Proportionalität bestehen. Von verschiedenen Autoren wurde eine Verminderung der Mastzellen bei

Arteriosklerose festgestellt (CAIRNS und CONSTANTINIDES 1954). Auch ließ sich die Zahl der Mastzellen bei verschiedenen Tierarten in Bezug stellen zu deren Arterioskleroseanfälligkeit (CONSTANTINIDES 1953). Bei Mastocytose wurden durch REMY (1957) Befunde bekannt, die im Gegensatz zur Arteriosklerose ein umgekehrtes Verhalten der Lipide und Lipoproteide zeigten. MENG und DAVIS (1954) konnten an Kaninchen bei hoher Postheparinserum-Kläraktivität des Plasmas bei diesen Tieren keine Arteriosklerose erzeugen, wohl aber bei niedriger Kläraktivität. TRENCKMANN (1956) sowie SCHETTLER, EGGSTEIN und JOBST (1958) fanden bei essentieller Hyperlipämie nach kurzfristiger Heparin-gabe eine rasche und starke Neutralfettsenkung im Serum, die nach Absetzen des Heparins wieder schnell auf die Ausgangswerte anstieg. Von KUO, JOYNER und REINHOLD (1956) wurde bei Arteriosklerose sowie bei schwacher Hyperlipämie nach Heparin-gabe in der Elektrophorese eine beschleunigte Wanderung der Lipoproteide als bei Gesunden beobachtet. Von einer Reihe von Autoren wurde beschrieben, daß sowohl die Spontanklärung, als auch die Heparin-induzierte Klärung bei Arteriosklerosekranken signifikant langsamer sei als bei Normalpersonen, und eine wesentlich geringere maximale Kläraktivität bei diesen auftrete, womit auf einen Klärfaktormangel geschlossen wurde (SCHETTLER und JOBST 1955, STORK und KUCEROVA 1957, MC DOWELL und Mitarbeiter 1958, MARTINIRANI 1962). Diesen Befunden wurde von HAVEL und PETERSON (1958), SANDHOFER, SAILER und BRAUNSTEINER (1961) widersprochen. Die Autoren erhielten bei Arteriosklerosepatienten im Vergleich zu Normalpersonen mit der Trübungsmessung, der freien Fettsäuren-Titration sowie der manometrischen Methode keine signifikant unterschiedlichen Werte. HARTELMANN (1963) fand bei optischen Messungen eine signifikante Lipoproteidlipase-senkung bei Arteriosklerose, bei Anwendung der Titrations-methode der freien Fettsäuren war der Unterschied nicht signifikant. Nach Heparininjektionen erhielt dieser bei Arteriosklerosekranken eine signifikante Erhöhung der

freien Fettsäuren im Plasma gegenüber den Kontrollpersonen bei gleichen Nüchternwerten beider Gruppen. Mit Hilfe des Fettklärtestes mit J^{131} -markiertem Olivenöl konnten SCHÖN und DEGENER (1962) in einem hohen Prozentsatz bei Arteriosklerosekranken ein längeres Verweilen der resorbierten Nahrungsfette im Blut mit entsprechender Neutralfettvermehrung feststellen.

Eine primäre Insuffizienz der Klärfaktorproduktion vermutete ANFINSEN (1956), da bei einigen Patienten mit idiopathischer Hyperlipämie nach Heparingaben keine Klärung eintrat. SCHÖLL (1962) vertrat die Ansicht, daß das Bedürfnis an klärfaktor möglicherweise mit dem Alter wächst. Auch an eine Hemmung der Klärungsreaktion durch pathologisch erhöhte Klärfaktor-Antagonisten muß gedacht werden (PILGERMAN und ROSE 1956). ENGELBERG (1962) fand bei Gesunden keine geringere Inhibitoraktivität als bei Arteriosklerotikern, wobei er Klärung und Lipolyse streng unterschied und eine geringere Hemmung der Lipolyse als die der Klärung fand.

Als weiterer pathogenitischer Faktor könnte auch ein Mangel an Acceptorprotein den Ablauf der Klärreaktion beeinflussen. Von BAKER (1956) konnte bei Plasmocytomkranken ein signifikant selteneres Auftreten der Arteriosklerose gegenüber Gesunden und Carcinomkranken festgestellt werden. NIKKILA und GRASBECK (1954) vermuteten bei der kindlichen Lipoidnephrose, deren starke Lipämie auf Heparingaben nur gering ansprach, einen Albumin-Acceptormangel.

Im Laufe der Jahre wurden schon viele Faktoren als Ursache der Arteriosklerose angesehen und wieder verworfen (THURNHERR und NIEDERBERGER 1954). Die Neutralfettvermehrung bei essentieller Hyperlipämie ist sicherlich ein Arteriosklerose begünstigendes Agens. Die postcenaale Hyperlipämie mit der Auslösung von Angina pectoris-Anfällen oder eines Myocardinfarktes ist ebenso wohl nur ein Einzelfaktor (HEZMANN 1961).

4. Therapie mit Heparin

Die Anwendung von Heparin in der Therapie hyperlipämischer Arteriosklerose sowie der essentiellen Hyperlipämie hat neben Verfechtern auch ablehnende Stimmen gefunden. Die positive Meinung vieler Autoren wurde besonders von der GOFMAN'schen Gruppe bestimmt, welche an Hand ihrer Ultrazentrifugenversuche sowohl am Kaninchen als auch beim Menschen eine Wirkung des Heparins auf die Lipoproteidverteilung erbrachten und neben der Hinauszögerung einer Cholesterinfütterungsarteriosklerose bei Kaninchen beim Menschen eine erhebliche Reduzierung von Angina pectoris-Anfällen fanden (GRAHAM und Mitarbeiter 1951). Diese Autoren verabreichten wöchentlich dreimal 50 bis 200 mg Heparin intravenös, intramuskulär oder subcutan. Die subjektiven Besserungen bei Angina pectoris wurden von zahlreichen Autoren bestätigt (HAENSCH 1960, SCHETTLER 1963 u.a.). GUBSER (1956) fand zum Beispiel bei 30 Patienten mit objektiv schwerer Angina pectoris im Gegensatz zu vegetativ stigmatisierten Patienten eine eindeutige Schmerzlinderung. Auch GILBERT und NALEFSKI (1949) stellten bei frischen Myokardinfarkt-Patienten nach intravenöser oder subcutaner Heparininjektion ebenfalls ein rasches Nachlassen der Schmerzen fest. Diese Ergebnisse konnten von SCHETTLER und Mitarbeitern (1961) nur bedingt bestätigt werden, denn es fanden sich gleichzeitig ebenso viele Versager. KUO und JOYNER (1957) konnten 5 bis 5 1/2 Stunden nach einer Fettmahlzeit auftretende Angina pectoris-Anfälle bei Arteriosklerotikern mit vorangegangenen Infarkt bzw. Angina pectoris - Anamnese durch intravenöse Injektion von Heparin bessern und die Besserung im EKG und Ballistokardiogramm erfassen. Placeboinjektionen ergaben dagegen keine Veränderungen. REGAN und Mitarbeiter (1961) konnten ebenfalls während einer postprandialen Lipämie mit Hilfe von Herzkatheteruntersuchungen nachweisen, daß die Koronardurchblutung, die um 20% niedriger als bei den Kontrollpersonen war,

nach Gabe von 60 mg Heparin normalisiert wurde. Sie zeigten gleichzeitig, daß dabei die Sauerstoffausnützung parallel zur Klärung verbessert würde.

Bei der Behandlung von peripheren arteriellen sowie cerebralen Durchblutungsstörungen fanden unter anderen THURNHERR und NIEDERBERGER (1954) sowie ENGELBERG und MASSEL (1953) positive Ergebnisse. Letztere konnten bei Patienten mit peripherer Gefäßsklerose in 8 von 14 Fällen eine bessere Durchblutung plethysmographisch feststellen. ENGELBERG und KUHN (1954) konnten bei Arteriosklerotikern nach Heparingabe eine Zunahme der arterio-venösen Sauerstoffdifferenz um 25 bis 30% messen. THURNHERR und NIEDERBERGER (1954) sahen bei 48 Coronarkranken und bei Patienten mit peripherer Arteriosklerose neben günstigen Ergebnissen der Heparinbehandlung auch Versager. SIMON und WRIGHT (1953) dagegen fanden ergometrisch gegenüber Placebos keine Besserung. Unbekannt ist dabei, ob Heparin beim Menschen auch auf die bereits in die Gefäßwand eingelagerten Lipide wirkt, diese Möglichkeit sollte nach HEYMANN (1961) jedoch prinzipiell eingeräumt werden.

Sehr eindrucksvoll sind die Untersuchungen von ENGELBERG und Mitarbeitern (1956), die bei einer Langzeittherapie über 2 Jahre mit subcutanen Heparininjektionen von zweimal wöchentlich 200 mg bei 105 Patienten, die einen oder mehrere Myokardinfarkte durchgemacht hatten, gegenüber einer mit Placebo behandelten Kontrollgruppe eine signifikant höhere Überlebensrate erzielen konnten. Bei einer über 9 Jahre laufenden Untersuchungsreihe, wobei die Behandlung der einzelnen Patienten durchschnittlich 5 Jahre dauerte, fanden ENGELBERG und Mitarbeiter (1960) bei der Heparinbehandlung eine Mortalität von 3,1%, bei der Placebogruppe von 11,5%. Dieser Unterschied von über 70% ist statistisch signifikant zu sichern. In 5 bis 10% dieser Fälle wurde eine verlängerte Blutungszeit gefunden, in einem Fall trat eine schwere haemorrh-

gische Blutung auf. Ja aber der eventuelle therapeutisch wirksame Gerinnungseffekt des Heparins nur 12 bis 18 Stunden, die Klärwirkung aber mindestens doppelt so lange anhält und die Behandlung in diesen Fällen im Abstand von mehreren Tagen und in höchstens einhalb bis eindrittel so großen Dosen wie bei der üblichen Thrombosebehandlung erfolgte, ist nach HEYMANN (1961) ein Gerinnungseffekt und die eventuell hierdurch bedingte Infarktverhütung unwahrscheinlich. Demgegenüber fand sich bei Myokardinfarktpatienten, die mit Dicumarolpräparaten behandelt wurden, nach einer zehnjährigen Behandlungszeit eine Sterblichkeitsquote von 10% bei regelmäßiger Einnahme, bei unterbrochener von 18,5%, bei der unbehandelten Kontrollgruppe lag die Sterblichkeit bei 38,1% (NICHOL und Mitarbeiter 1958). Andere Statistiken mit Dicumarolpräparaten sollen (nach HEYMANN 1961) ein Sterblichkeitsverhältnis von Behandelten zu Unbehandelten wie 1:2 oder 1:3 enthalten. CONSTANTINIDES und Mitarbeiter (1953, 1956) beschrieben, daß an cholesteringefütterten Kaninchen mit Arteriosklerose durch Heparin-gaben die Ausbreitung von Atheromen in den großen Eingeweidearterien behindert wird. STARK (1957) gelang es, im Augenhintergrund die Rückbildung totaler oder subtotaler Gefäßverschlüsse während Heparin-behandlung deutlich zu machen.

Eine Hyperlipämie mit ihren Folgeerscheinungen kommt auch beim schlecht eingestellten Diabetes mellitus, bei schweren Nephrosen sowie bei der seltenen, hyperlipämischen Pankreatitis vor. Von HERZSTEIN und Mitarbeitern (1954) konnte bei der Nephrose eine Abnahme der Neutralfettkonzentration nach Heparin-gaben beobachtet werden. Nach Einstellung eines unkontrollierten Diabetes mellitus kann man ebenfalls Heparinpräparate versuchen (SCHETTLER 1963).

Ähnliche Ergebnisse sahen MATRAS (1956), PFLEGER und TIRSCHKE (1956) sowie HAENSCH (1958, 1960) bei der Heparinbehandlung der Xanthomatose. LEVER und Mitarbeiter

(1954), HOLLISTER und KANTER (1955), JAHNKE und SCHILD (1958) und andere berichteten ebenfalls über die Senkung der Neutralfette bei essentieller Hyperlipämie unter der Heparintherapie. JAHNKE und SCHILD vermuteten einen Heparinmangel, welcher sich mit dem Protamin-Titrationstest aber nicht nachweisen ließ, während ANFINSEN (1956) bei der idiopathischen Hyperlipämie nach Heparin keine Klärung beobachten konnte und eine primäre Klärfaktorinsuffizienz als Ursache dieser Erkrankung annahm. Bei essentieller xanthomatöser Hypercholesterinämie ist Heparin dagegen wirkungslos (SCHETTLER 1963).

Als Nebenwirkung des Heparins bei Langzeitbehandlung zeigt sich in ca. 45% ein verschieden starker Haarausfall bis zur totalen Alopezie. Diese besonders für Frauen unangenehme Erscheinung ist nach Absetzen des Präparates wieder voll reversibel (SCHETTLER 1961). Gelegentlich sind Tachycardien, Schwindelgefühl, Brechreiz, Erbrechen oder Hitzegefühl bei intravenöser oder subcutaner Applikation zu beobachten. Es kann auch bei den hochgereinigten Heparinpräparaten eine Allergie auftreten, Schock oder Kollaps nach intravenösen Gaben dagegen sollen sehr selten sein. ENGELBERG fand, wie oben beschrieben, bei seinen langdauernden Untersuchungsreihen in 5 bis 10% eine Gerinnungszeitverlängerung und in Einzelfällen Blutungen.

Als strikte Kontraindikation der parenteralen Heparintherapie gab SCHETTLER (1961) an:

1. alle Formen der haemorrhagischen Diathese
2. Ulcus ventriculi oder Ulcus duodeni
3. haemorrhagische Colitis
4. alte oder frische Apoplexien
5. Endocarditis lenta
6. schwere Leber- und Nierenerkrankungen.

Um die umständliche und für den Patienten lästige parenterale Verabreichung von Heparin insbesondere bei der Langzeitbehandlung zu umgehen, wird seit Jahren versucht,

dieses in einer einfacheren Form zu applizieren.

FISCHER und ASTRUP versuchten schon 1939 eine orale Applikation des Heparins zur Thromboseprophylaxe, fanden aber, daß Heparin im Magen-Darmkanal nicht resorbiert wird. WINDSOR und CRONHEIM (1961) geben an, daß man die geringe gastrointestinale Resorption des Heparins durch gleichzeitige Gabe von EDTA (Äthylendiamintetraacetat) um ein Vielfaches steigern kann. Nach Meinung der Autoren beruht die Resorptionsteigerung auf dem calciumbindenden Effekt des EDTA. Diese Substanz ist die wirksamste aus einer Reihe von calciumbindenden und die Heparinresorption fördernden Stoffen, zu denen Natriumcitrat, die Ionenaustauscher Amberlit und Permutit, secundäres Natriumphosphat, sowie Natrium-Metaphosphat gehören. Die Autoren vermuten neben der Calciumbindung noch andere resorptionsfördernde Faktoren.

LITWINS und Mitarbeiter (1951) versuchten erstmalig, Heparin sublingual zu verabreichen. Natrium-Heparin-Waffeln zu 125 mg wurden innerhalb 10 Minuten resorbiert. Bei Messung der Gerinnungszeit nach Lee-White fand sich eine deutliche Verlängerung derselben auf 20 bis 30 Minuten 1/2 bis 4 Stunden nach der Applikation. Von einer Reihe von Autoren wurde demgegenüber festgestellt, daß nach sublingualer Verabreichung des Heparins die Gerinnungszeit nicht verändert wird (McDEVITT und Mitarbeiter 1952, FIELD und Mitarbeiter 1953, LABORIT und Mitarbeiter 1954, SCARDIGLI und Mitarbeiter sowie BONO und CORTINOVIS 1955, FULLER 1958, SCHÖLL und KOPITZKI 1964).

Lipämieklärende bzw. therapeutische Wirkungen nach sublingualer Zufuhr wurden ebenfalls festgestellt. Zuerst waren es LABORIT und Mitarbeiter (1954), die bei Atheromatose- und Lipoidnephrose-Patienten in der Papierelektrophorese eine Beweglichkeitszunahme der Lipoproteide geringer Molekülgröße mit einer Verminderung der Gesamtlipide und des Cholesterins beobachteten. SCARDIGLI und Mitarbeiter (1955) fanden die gleichen Elektrophoresebefunde und

konnten auch photometrisch eine Plasmaklärung nach Fettbelastung feststellen. FULLER (1958, 1960) beobachtete bei postcenaler Hyperlipämie mit der Trübungsmessung eine Klärung, wobei er bei Verabreichung von weniger als 1000 I.E. Kalium-Heparin unterschiedliche, nicht verwertbare Ergebnisse, bei mehr als 1.500 I.E. eine fortschreitend geringere Wirkung fand. Als Standarddosierung benutzte er deshalb 1.500 I.E. Kalium-Heparin. BERKOWITZ, LIKOFF und SPITZER (1959) konnten FULLER's Befunde mit Hilfe des radioaktiven Fett-Toleranz-Tests sowie des Glycerin- als auch freien Fettsäureanstiegs gegenüber den Kontrollen bestätigen. Auch SHAFTEL und SELMAN (1959) konnten mit der Trübungsmessung nach einer Standard-Fettmahlzeit eine Klärfaktoraktivierung beobachten. Als optimale Dosis gaben sie 1.500 bis 4.500 I.E. Kalium-Heparin an. Der Kläreffekt begann 1 Stunde nach Heparinverabreichung und dauerte mehrere Stunden an. In der 4. Stunde war die Klärung zu 63% abgelaufen. Auch sie fanden bei höherer Heparindosis keine Kläraktivitätssteigerung.

Auch nach buccaler Verabreichung von Kalium-Heparin konnten HIRSHLEIFER und NAYAK (1961), von der verschiedenen Auflösungsdauer der Präparate abhängig, wirksame Ergebnisse erzielen.

Therapeutische Erfolge beschrieben Lorenzi und Mitarbeiter (1957) bei Angina pectoris mit 3 x 1.500 bis 3.000 I.E. sublingualer Heparin-gaben. ALBRIEUX und Mitarbeiter (1957) sahen Erfolg bei Angina pectoris, sekundären Hyperlipämien und bei der Infarktprophylaxe. 1960 veröffentlichte FULLER eine Studie über die Langzeittherapie mit sublingualem Heparin bei Infarktpatienten, denen er 3 x täglich nach den Mahlzeiten 1.500 bis 4.000 I.E. verabreichte. Bei 130 Patienten ergaben sich insgesamt 3.361 Patienten-Behandlungsmonate, d.h. durchschnittlich 25,9 Monate pro Patient. In der Patientengruppe traten 12 Reinfarkte gegenüber 38 bei der Kontrollgruppe ein, ein statistisch signifikantes Ergebnis ($P < 0,01$). Negative Ergebnisse

mit der sublingualen Heparin-gabe erzielten dagegen REFN und RAASCHOU (1952), die nach 10.000 bis 50.000 I.E. Heparin keine Änderung des Heparin-gehaltes im Plasma mit der Protamintitration feststellen konnten, desgleichen McDEVITT und Mitarbeiter (1952), die mit 9 verschiedenen Natrium-Heparin-Präparaten von 4 Firmen in Puder- und Pillenform keine eindeutige Kläraktivitätssteigerung messen konnten. Auch ENGELBERG (1959) beschrieb, daß sich buccal und sublingual verabreichtes Kalium-Heparin (Clarín) bei 85 % der behandelten Patienten unwirksam zeigte. HEYMANN (1961) erhielt bei der Nachprüfung der Fullerschen Versuche mit Kalium-Heparin an 40 Versuchspersonen nach dosierter Fettmahlzeit ebenfalls keine positiven Ergebnisse mit der Trübungsmessung. SCHÖN und BRAUNE (1963) sowie SCHÖN und SAUER (1963) prüften sublingual verabreichtes Natrium-Heparin (Nordmark) in Dosierung von 6.000 bis 9.000 I.E. in 20 Doppelbelastungen mit dem J¹³¹-Fettklärtest bzw. in 1 bis 2 Stunden später erhaltenen Blutproben den Anstieg der freien Fettsäuren. Sie konnten nur gelegentlich einen positiven Erfolg feststellen, im Ganzen waren ihre Ergebnisse negativ.

Im Gegensatz zu den beiden zuletzt zitierten Arbeiten stehen die Untersuchungsergebnisse von SCHÖLL und KOPITZKI (1964). Diese Autoren konnten sowohl bei sublingual als auch bei rectal verabreichtem saurem Natrium-Heparin N 9 (Nordmark) mit Hilfe der nephelometrischen Methode, als auch mit der Titration der freigesetzten Fettsäuren eine signifikante Kläraktivität nachweisen.

5. Eigene Untersuchungen

5.1. Fragestellung

Mit dieser Arbeit galt es zu prüfen, ob ein aus Rohheparin hergestelltes saures Natrium-Heparin (N 10) die gleiche, Lipämie-klärende Wirkung hat, wie die aus Reinheparin hergestellte gleiche Substanz (N 9), oder

ob die im Rohheparin enthaltenen Zusätze eine Resorption verhindern oder aber verbessern. Geprüft werden sollte dieses saure Natrium-Heparin N 10 nach sublingualer sowie nach rectaler Verabreichung in verschiedenen Dosierungen an Hand der sehr empfindlichen Methode der Bestimmung freier Fettsäuren, da diese als ein direkt proportionales Maß der Lipoproteidlipaseaktivität angesehen werden können.

5.1.1. Zu prüfende Substanz

Für diese Untersuchungen wurde ein von der Firma Nordmark unter dem Aspekt der sublingualen als auch rectalen Verabreichungsmöglichkeit entwickeltes Heparinpräparat verwendet. Dabei gingen die Hersteller davon aus, daß an sich die hohe elektrische Ladung des Heparinmoleküls ein Hindernis für die Resorbierbarkeit durch die Mundschleimhaut sei. Ohne Änderung der Gesamtstruktur des Moleküls ist eine Ladungsverminderung aber dadurch möglich, daß man es nicht als Neutralsalz, sondern in seiner sauren Form verabreicht. Da die Azidität der freien Heparinsäure jedoch so stark ist, daß eine lokale Schleimhautätzung möglich wäre, wählte man die Form des Heparins, bei der nur die durch die Sulfatgruppen bedingte Azidität neutralisiert ist, die Carboxylgruppen aber als freie Säuregruppen vorliegen. Nach Angaben der Hersteller stellt diese mit der Chargennummer N 10 versehene Substanz ein Alpha-Heparin dar, dessen Schwefelsäuremonoester als Natriumsalze vorliegen, wohingegen die Carboxylgruppen der Glucuronsäuren unverändert sind. Das pH einer 5%igen Lösung dieses Stoffes beträgt 2,1. Die Substanz ist in Wasser leicht löslich. Der Heparinegehalt des N 10 beträgt 98,3 Einheiten pro mg, der Stickstoff 3,38%, der Schwefel 9,06%, das Verhältnis Schwefel zu Stickstoff ist 1,24, der Natriumgehalt beträgt 7,46%. Diese Substanz, als saures Natrium-Heparin bezeichnet, wurde aus Roh-Heparin hergestellt. Es ist ein graues Pulver, das in Wasser

leicht löslich ist.

Im Vergleich dazu ist das von SCHOLL und KOPITZKI (1964) unter der Bezeichnung N 9 verwendete Heparinpräparat aus Rein-Heparin, wie es in der U.S.P. XVI beschrieben ist, hergestellt worden. Infolgedessen besitzt letzteres eine höhere Aktivität von etwa 150 Heparin-Einheiten pro mg.

5.2. Methodik

Die Klärfaktor-induzierende Wirkung einer Substanz kann man auf verschiedene Weise nachweisen. Im in vivo-Versuch bestimmt man die Kläraktivität nach Verabreichung der Testsubstanz nephelometrisch durch die Verminderung einer alimentären Lipämie. Diese Methode hat den Vorteil der relativ einfachen Durchführbarkeit, der sehr großen Empfindlichkeit der photometrischen Messung und der möglichen Aussage über die Reaktion des Gesamtorganismus auf die Testsubstanz, da die Lipämieverminderung auch durch einen anderen Mechanismus erfolgen könnte als durch die intravasale Lipolyse, was man im in vitro-Versuch dann nicht fassen kann (SCHÖLL 1963). Voraussetzung für die Anwendbarkeit dieser Methode wäre, daß die Abnahme der optischen Trübung dem Ablauf der Triglyzeridhydrolyse gleichzusetzen ist. Einen mehr oder weniger parallelen Verlauf dieser beiden Vorgänge nimmt zum Beispiel ANFINSEN (1954) an. Andere Autoren bestreiten die Identität von Lipolyse und Klärung (ZÖLLNER und Mitarbeiter 1961, LEBRETON und Mitarbeiter 1957). Letztere geben an, die Lipolyse sei eine Bedingung für die Klärung, würde diese aber nicht allein bestimmen. Da nach SCHÖLL (1963) jedes Postheparinserum seinen eigenen Proportionalitätsfaktor hat, ist dieses Verfahren für klinische Vergleichsuntersuchungen an verschiedenen Patienten ungeeignet. Es dient lediglich zum qualitativen Nachweis einer Kläraktivität. Im quantitativen Vergleich kann ein Teil der freien Fettsäuren aus Teilchen frei werden, die nicht zur Trübung beitragen. Ähnliche Einwände wurden von

KRAUPP (1963) geltend gemacht. Die Trübung des Serums ist nicht nur vom Triglyzeridgehalt abhängig, sondern auch von der Natur der Emulgatoren und von der Größe der einzelnen Fetteilchen. Auch bei konstanter Wellenlänge und bei konstantem Beobachtungsabstand nimmt das gestreute Licht proportional der Teilchengröße und proportional dem Quadrat ihres Volumens zu, so daß der Durchmesser der Teilchen einen viel größeren Einfluß auf die Trübung hat als deren Zahl. Diese Formel gilt nur bis zu einem Teilchendurchmesser von ca $1/15$ der verwendeten Wellenlänge, d.h. etwa 30 μ p; bei größeren Teilchen kommen zahlreiche weitere Effekte dazu wie Reflexion, Brechung, echte Absorption von Licht und unter Umständen Polarisationserscheinungen (SCHÖLL 1963). Weiterhin beschreibt KRAUPP (1963), daß im Verlaufe der Reaktion sekundär Veränderungen der physikalisch-chemischen Eigenschaften des Substrats oder der Reaktionsprodukte auftreten können, die zu einer Trübung führen können, wie zum Beispiel durch Bildung von Calcium-Seifen. Auch können exogene Einflüsse auf die Oberflächenstruktur der Chylomikronen oder Lipoproteide, zum Beispiel Protamin, deren Löslichkeitszustand verändern und eine vermehrte Trübung hervorrufen. Weitere Fehlerquellen sind die Veränderung der Dichte bei Hämolyse der Erythrozyten bei Blutentnahmen, die Alterung der Seren und die Temperatur bei der Messung. Der weit- aus größte Unsicherheitsfaktor dieser Methodik aber ist die erhebliche biologische Schwankungsbreite des Ablaufs der Fettresorption, der außerhalb der natürlichen Streubreite liegt. So gelingt es fast nie, bei einer Versuchsperson bei wiederholten Fettbelastungen identische oder vergleichbare Resorptionskurven zu erhalten (SCHETTLER 1963). Diese Methodik ist also beim Nachweis von geringeren Kläraktivitäten, wie sie nach sublingual bzw. rektal verabreichtem Heparin zu erwarten sind, mit so vielen Störgrößen behaftet, daß ihre Anwendung nur mit

großer Zurückhaltung erfolgen sollte.

Zweitens kann man die Kläraktivität indirekt messen, indem man durch Titration diejenige Menge freier Fettsäuren bestimmt, die aus einem künstlichen Triglyzeridsubstrat nach Vermischung mit einem Postheparinserum freigesetzt werden. Diese von DOLE (1956) ursprünglich angegebene und von SCHÖLL und KOPITZKI (1964) modifizierte Methodik der Kläraktivitätsbestimmung entspricht nach den Angaben Doles an Genauigkeit und Einhaltung den von KERN, STEINMANN und SANDERS (1961) geforderten Kriterien. DOLE beschreibt diese Methode als "schnell und einfach, bei einer Fehlerbreite von 3% und einer Empfindlichkeit, die für eine genaue Titration von freien Fettsäuren in einem ccm Plasma genügt." Dabei soll dieser Test für die freien Fettsäuren ziemlich spezifisch sein, da sie quantitativ den bei weitem größten Teil der Säuren im Plasma darstellen.

Analog zur Messung der durch die Lipoproteidlipase freigesetzten Fettsäuren kann man (drittens) auch das Glyzerin als weiteres Reaktionsprodukt als Maß der Lipoproteidlipaseaktivität manometrisch bestimmen (KERN, STEINMANN und SANDERS 1961). Bei größeren Kläraktivitäten soll dabei die Lipoproteidlipase-Bestimmung mit der manometrischen Methode der titrimetrischen gleichwertig sein, bei geringeren Aktivitäten dagegen ist die titrimetrische empfindlicher (KRAUPP 1963).

Das hier benutzte Verfahren zur Klärfaktorbestimmung lehnt sich, wie angegeben, an die von SCHÖLL und KOPITZKI (1964) angegebene Methode zur Bestimmung der Lipoproteidlipaseaktivität an.

Die Kläraktivität wird als die Wirkung des Fermentes Lipoproteidlipase auf eine vorgegebene Neutralfettlösung definiert, die wie oben angegeben bestimmt wird.

5.2.1. Reagenzien

Als Substrat wurde eine künstliche Triglyceridlösung

verwendet, die folgendermaßen zubereitet wurde:

Ein Teil 10%iges Lipofundin (BRAUN-MELSUNGEN) und ein Teil Normalserum (Mischserum, daß nicht hämolytisch, nicht lipämisch und nicht ikterisch sein durfte; es wurde aus ein bis zwei Tage altem Serum (sogenanntes A-Serum) gewonnen und im Kühlschrank aufbewahrt). Lipofundin ist eine zur intravenösen Infusionstherapie hergestellte, mit hydriertem Lecithin stabilisierte Fettemulsion. Die Zusammensetzung ist nach Angaben der Firma wie folgt: 100 g Baumwollsaatöl, 50 g Sorbit, 15 g Phosphatide in 1000 ml. Eine Analyse von SCHÖLL und KOPITZKI (1964) ergab: 96,3 g pro Liter Baumwollsaatöl, 0,34 g pro Liter Lipidphosphor. Die Endkonzentration der Triglyceride in dem Reaktionsgemisch betrug 0,0232 g pro ml, berechnet aufgrund der Firmenangabe, nach obigen Autoren 0,0194 g pro ml. Der Triglyceridgehalt des normalen Nüchternserums ist im Verhältnis zu dem der verwendeten Fettemulsion sehr klein (etwa 1%), so daß er vernachlässigt werden kann. Wichtig ist, daß der Gehalt an Normalserum sowie an Triglycerid in allen Versuchen konstant ist, da sich sonst die gemessene Kläraktivität verändert. Somit würde nämlich das im Ansatz vorgesehene Verhältnis Ferment zu Substrat gestört und damit die Bedingungen der idealen Fermentbestimmungsreaktion nicht erfüllt werden.

Die für den Ansatz benötigte Albuminlösung wurde aus 20%igem Humanalbumin (50 ml Ampullen der Behring-Werke) hergestellt. Um das von der Herstellern der Originallösung zur besseren Haltbarkeit zugesetzte keimtötende "Thiocid", das die enzymatische Reaktion hemmt, zu entfernen, wurde jeweils eine Ampulle Humanalbumin gegen destilliertes Wasser in einem 10 l fassenden Erlenmayerkolben bei Zimmertemperatur mit viermaligem Wasserwechsel dialysiert. Der Erlenmayerkolben wurde während der 12 bis 16 Stunden dauernden Dialyse auf einem Schüttelapparat zur besseren Durchmischung durchgeschüttelt. Anschließend wurde die dialysierte Albuminlösung gefriergetrocknet und in verschlossenen Gläsern bis zu maximal 14 Tagen bei 4°C aufbewahrt. Älteres

Albumin ergab ganz erheblich abweichende Kurvenverläufe. Zur Bestimmung der Lipoproteidlipaseaktivität wurden 0,4 g Albumin mit 2 ml Trispuffer p_H 8,2 (Trioxymethylaminomethan, eingestellt mit 0,1 n HCl) angesetzt. Höhere Albuminkonzentrationen beeinflussen die Reaktion nicht, geringere stören sie, da dann mangels Acceptorprotein das Freiwerden von Fettsäuren nach dem Massenwirkungsgesetz gestoppt wird.

Die Extraktionslösung stellt ein Gemisch aus einem Teil n-Heptan, fünf Teilen Isopropylalkohol und 0,1 Teil 1 n H_2SO_4 dar. n-Heptan (Merck) wurde durch Destillation über Natriumhydroxydplättchen gereinigt. Die 1 n H_2SO_4 wurde aus einer Titrisollösung (Merck) hergestellt.

Die Schliffstopfen-Reagenzgläser zur Inkubation als auch die spitzen Zentrifugengläser, die zur Titration verwendet wurden, mußten, um eine Fehlerquelle infolge der Alkalität des Glases auszuschließen, in folgender Weise silikonisiert werden: Ein ml Silikonöl wurde in 15 ml Tetrachlorkohlenstoff gelöst und die Innenwände der Röhrchen mit dieser Lösung benetzt. Die Röhrchen wurden dann etwa eine Viertelstunde umgedreht zum Ablaufen stehen gelassen und dann im Wärmeschrank mindestens zwei Stunden bei $300^{\circ}C$, besser über Nacht mit langsamem Erhitzen und Abkühlen zur Schonung der sehr leicht zerbrechlichen Schliffstopfengläser belassen.

Für die Titration der freien Fettsäuren wurden die folgenden Reagenzien benötigt: Die 0,01%ige Indikatorlösung, die aus einer 0,1%igen Stammlösung aus 0,1 g Thymolblaukristallen ad 100 ml 90%igem Äthylalkohol dadurch hergestellt wurde, daß 10 ml der Stammlösung ad 100 ml wieder mit 90%igem Äthylalkohol verdünnt wurden.

Die Natronlauge zur Titration : Es wurde erst eine Stammlösung hergestellt, indem man 7,2 g NaOH p.a. in rotules ad 100 ml kohlenstofffreiem aqua destillata* auffüllte, was eine 1,8 n NaOH ergab (* aqua destillata kochen, dann erkalten lassen und einige Zeit unter Stickstoff-Atmos-

phäre stehen lassen). Eine Gebrauchslösung daraus erhielt man durch Verdünnung: 1 ml Stammlösung 1,8 n NaOH ad 100 ml aqua destillata ergab 0,018 n NaOH.

Die 0,01%ige Indikatorlösung wurde aus einer 0,1%igen Stammlösung aus 0,1 g Thymolblaukristalle ad 100 ml 90%igen Äthylalkohol dadurch hergestellt, daß 10 ml der Stammlösung ad 100 ml wieder mit 90%igem Äthylalkohol verdünnt wurden.

5.2.2. Durchführung der Kläraktivitätsbestimmungen

Den Probanden, die nicht nüchtern waren, sondern morgens ein kleines, fettfreies Frühstück erhalten hatten, wurden 8 bis 10 ml Venenblut entnommen (Kontrollblut A). Ihnen wurde dann die Testdosis saures Natrium-Heparin N 10 sublingual bzw. rektal verabreicht. 60 bzw. 75 Minuten nach Verabreichung des N 10 wurde den Versuchspersonen erneut ca. 5 ml Venenblut entnommen (Blutprobe B). Während dieser Zeit konnten die Probanden sich normal bewegen.

Die Blutproben, die weder lipämisch, hämolytisch noch ikterisch sein durften, wurden im Kühlschrank bei 4°C bis zur vollständigen Gerinnung und Retraktion bis zu zwei Stunden aufbewahrt. Dann wurden die kalten Blutproben bei 3000 Umdrehungen pro Minute ca. 5 Minuten zentrifugiert und das Serum A bzw. B in dickwandige Reagenzgläser abpipettiert. Die Blutentnahmen wurden, damit das Serum durch Ansaugen mit der Spritze nicht hämolytisch wurde, mit Kanülen, aus denen das Blut ablaufen konnte, vorgenommen.

Der Ansatz des Reaktionsgemisches war folgendermaßen: In zwei dickwandige Reagenzgläser A bzw. B wurden dann bei Zimmertemperatur je 0,6 ml Albuminlösung und 1,4 ml künstlicher Triglyceridemulsion gegeben und nach Vermischen je 1 ml abpipettiertes Serum A bzw. B hinzugefügt und erneut kräftig geschüttelt. Unmittelbar danach wurde 0,5 ml des Reaktionsgemisches in mit je 5 ml Extraktionslösung gefüllte, silikonisierte Reagenzgläser mit Schliffstopfen A₁ bzw. B₁ gegeben, und diese nach abermaligem Schütteln bei 4°C aufbewahrt. Die Reagenzgläser A bzw. B mit dem Reaktionsgemisch wurden gleich nach Entnahme dieser aliquoten Teile in ein Wasserbad von genau 37°C verbracht und mittels

eines Rührers ständig durchmischt. Die automatische Rührung erfolgte, um ein Aufrahmen der Fettemulsion zu vermeiden. Nach Inkubationszeiten von 30, 60 und 90 Minuten wurden jeweils wieder aliquote Teile von 0,5 ml entnommen (A_2 bis A_4 bzw. B_2 bis B_4), in die Extraktionsröhrchen gegeben und nach dem Schütteln im Kühlschrank aufbewahrt, oder aber nur 10 Minuten bis zur Weiterverabreichung stehengelassen. Dabei wurden dann den Extraktionsgemischen je 2 ml n-Heptan und 3 ml bidestillierten Wassers hinzugefügt und wieder kräftig geschüttelt. Nach der Trennung der Phasen wurden aus der oberen Heptanschicht, in der die freien Fettsäuren gelöst vorlagen, jeweils zwei aliquote Teile von 0,5 ml zu Doppelbestimmungen in silikonisierte Spitzgläser zur Titration abpipettiert und mit 0,1 ml der Indikatorlösung versetzt.

Die Titration:

Die Titration der freien Fettsäuren wurde mit 0,018 n NaOH, die mit einer 0,02 n H_2SO_4 oder 0,02 n HCl (Titrisol) vor jeder Titration eingestellt wurde, vorgenommen. Sie erfolgte mit einem Mikrotitrator (Beckman Instruments), der eine Ablesung von 0,01 Mikroliter erlaubt. Die täglich frisch eingefüllte Natronlauge wurde bei diesem Apparat mit Hilfe einer Mikrometerschraube durch eine in die Lösung gerade eintauchende Glaskapillare in die Titrationvorlagen gedrückt. Zur Verdrängung von Kohlensäure wurde unter Stickstoffatmosphäre titriert. Der Stickstoff wurde ebenfalls mittels einer Glaskapillare in die Vorlagen eingeführt, nachdem er vor dem Einleiten durch eine oder zwei mit 1 n NaOH gefüllte Waschflaschen geströmt war. Zur genauen Erkennung des Umschlagpunktes, der beim Übergang von Gelb zu Grün liegt, muß durch Herausheben der Kapillare über den Flüssigkeitsspiegel der Stickstoffstrom unterbrochen werden.

Für die Titration ist es günstig, wenn man die freie Fettsäuren-Konzentration nicht zu hoch vorlegt, da dann der Umschlagpunkt durch eventuelle Aussalzungen nicht genau abzulesen ist.

2.3. Probanden

Als Probanden für die Versuche wurden Personen aller Altersgruppen zwischen 15 und 72 Jahren beiderlei Geschlechts herangezogen. Es handelte sich um gesunde Freiwillige oder stationäre Patienten. Bei der Auswahl wurde darauf geachtet, daß die Versuchspersonen weder an Arteriosklerose, noch an Diabetes mellitus oder einer Leberkrankung litten, bis auf vereinzelte, im Text angeführte Ausnahmen.

Zur orientierenden Kontrolle des Blutgerinnungsvorganges wurde bei einem Teil der Probanden die Rekalkifizierungszeit nach HOWELL unter Verwendung von unverdünntem Citratplasma nach Angaben von JÜRGENS und BELLER (1959) vorgenommen, um Aussagen über eine eventuelle gerinnungshemmende Aktivität des sublingual bzw. rektal verabreichten Heparins machen zu können.

2.4. Auswertung

Die statistische Auswertung der Kläraktivität geschah wie folgt: Die Differenz der Enzymaktivitäten vor und nach Gabe von saurem Natrium-Heparin wurden für jede vergleichbare Versuchsreihe errechnet ($Dx_1 - Dx_2 = D$), von diesen der Mittelwert ($M_D = \frac{\sum D}{n}$) und die Standardabweichung der Differenzen ($s = \sqrt{\frac{1}{n-1} (\sum D^2 - (M_D \cdot \sum D))}$) sowie die Standardabweichung des Mittelwertes bestimmt: $s_M = \frac{1}{\sqrt{n}} \cdot s$.

Auf Grund der Nullhypothese erfolgte die statistische Prüfung der Mittelwerte mit Hilfe des Prüfquotienten $t = \frac{M_D}{s_M}$. Daraus wurde die Wahrscheinlichkeit P erhalten,

mit welcher der Mittelwert zufällig von Null verschieden ist.

5.3. Ergebnisse

Zur Erprobung der Versuchsanordnung und um einen Vergleichsfaktor zu der nach sublingualer bzw. rectaler Resorption von unverändertem Heparin auftretenden Kläraktivität zu erlangen, wurden bei 4 Versuchspersonen 5000 IE Heparin (Liquemin "Roche") intravenös injiziert. Die Blutentnahmen erfolgten 5 Min. nach der Verabreichung des Heparins. Die Ergebnisse sind in Abb. 1) dargestellt.

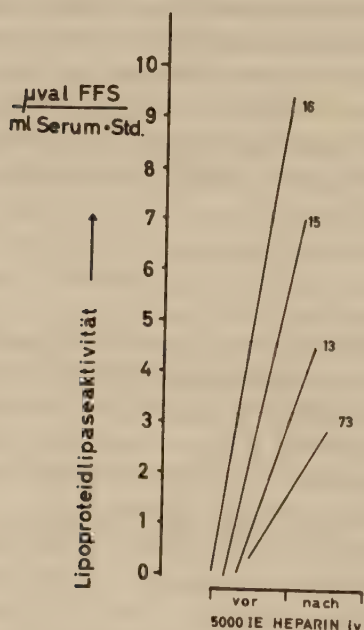


Abbildung 1.: Kläraktivität nach intravenöser Verabreichung von Heparin (5000 IE Heparin "Liquemin Roche") bei 4 Probanden

Danach traten Lipoproteidlipaseaktivitäten zwischen 2,5 und 9,5 $\mu\text{val FFS/ml} \cdot \text{Std.}$ auf. In weiteren Versuchen wurde das schon erprobte Präparat N 9 5 Personen sublingual verabreicht (s. Tab. 1 und Abb. 2).

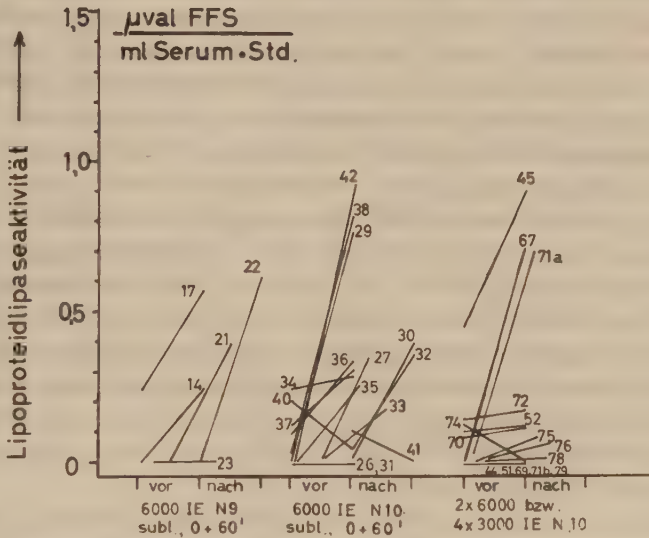


Abbildung 2.: Lipoproteidlipaseaktivität nach sublingualer Verabreichung von zwei sauren Natriumheparinpräparaten N 9 und N 10. Blutentnahmen vor und 60 Min. nach der Heparinverabreichung.

Der hierbei geobachtete Anstieg der Kläraktivität lag zwischen 0,24 und 0,61 $\mu\text{val FFS/ml} \cdot \text{Std.}$ Bei einem Patienten zeigte sich kein Anstieg der Kläraktivität.

Im Mittel betrug die Kläraktivität 0,314 uval FFS/ml · Std. und war signifikant gegenüber Null unterschiedlich.

Bei den folgenden 15 Probanden, denen 6000 IE saures Natrium-Heparin N 10 sublingual verabreicht wurde und die Blutentnahmen vor sowie 60 Min. nach Gabe der Testsubstanz erfolgten, konnte in fast dreiviertel der Fälle ein Kläraktivitätsanstieg beobachtet werden (Tab. 2, Abb. 2). Die mittlere Kläraktivität betrug in diesen Versuchen 0,27 μ val FFS/ml · Std., die höchste Kläraktivität betrug 0,92 μ val FFS/ml · Std. Von den 15 Probanden wurde in 4 Fällen, das sind 20,6%, kein Kläraktivitätsanstieg gefunden. Diese 4 Fälle setzen sich zusammen aus 2 Patienten mit einem malignen Tumor, einer 49-jährigen Patientin ohne bekannte Diagnose und einer 68-jährigen Patientin mit Zustand nach Myocardinfarkt. Die größte Freisetzung unveresteter Fettsäuren wurde bei einer 65-jährigen Frau mit einem Wallenberg-Syndrom, bei einem 21-jährigen Mädchen mit Morbus Hodgkin sowie einer 57-jährigen Frau mit einer Anämie unbekannter Genese gefunden. Die Fälle ohne Kläraktivitätsanstieg wurden bei der statistischen Auswertung mitberücksichtigt. Danach war die durchschnittliche Kläraktivitätssteigerung von 0,27 μ val FFS/ml · Std. von Null signifikant unterschiedlich ($P > 0,001$).

Abbildung 3 zeigt den Verlauf der Kläraktivität bei einem der Patienten, welcher 6000 IE N 10 sublingual erhielt. Es ist ersichtlich, daß in dem 60 Min. nach der Applikation gewonnenen Blut bei der Inkubation mit dem Substrat eine der Inkubationsdauer proportionale Klärfaktoraktivitätssteigerung eintrat.

In einer weiteren Versuchsreihe mit 15 Versuchspersonen wurde die Dosis des sublingual verabreichten sauren Heparins auf 12000 IE gesteigert, die zu 3 x 4000 oder 2 x 6000 IE gegeben wurden (Tab. 3, Abb. 2). In dieser Reihe blieb eine Klärfaktoraktivitätssteigerung bei 6 Patienten aus (40%). Die übrigen Werte lagen zwischen

0,01 und 0,71 $\mu\text{val FFS/ml} \cdot \text{Std.}$, sie betrugen im Mittel 0,122 $\mu\text{val FFS/ml} \cdot \text{Std.}$

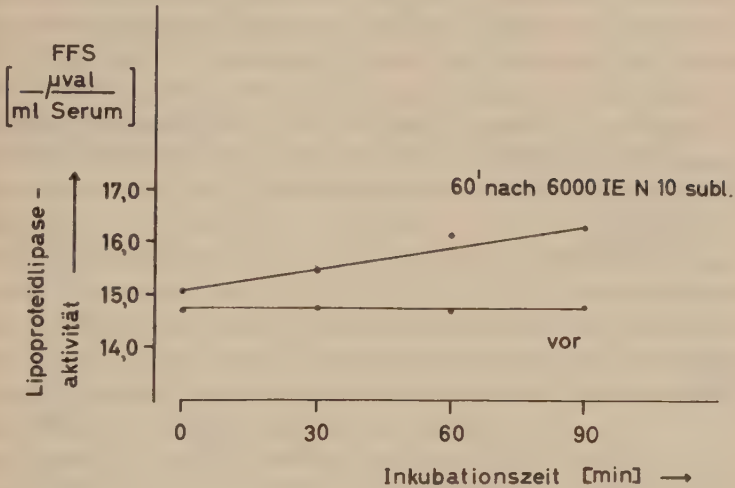


Abbildung 3.: Lipoproteidlipaseaktivität: Beispiel eines Kurvenverlaufs der Freisetzung von unveresterten Fettsäuren im Serum, welches vor und 60 Min. nach 6000 IE sublingual verabreichten N 10-Heparins gewonnen wurde.

Der mittlere Klärfaktoranstieg konnte statistisch nicht gesichert werden. Die durchschnittliche Kläraktivität war gegenüber der Dosis von 6000 IE um etwa die Hälfte vermindert.

Rectale Applikationen von saurem Natrium-Heparin N 10 wurden ebenfalls unter verschiedenen Dosierungen durchgeführt. Bei 7 von 10 Probanden, welche 6000 IE N 10 erhielten, konnte keine Klärfaktoraktivierung gefunden werden (Tab. 4, Abb. 4).

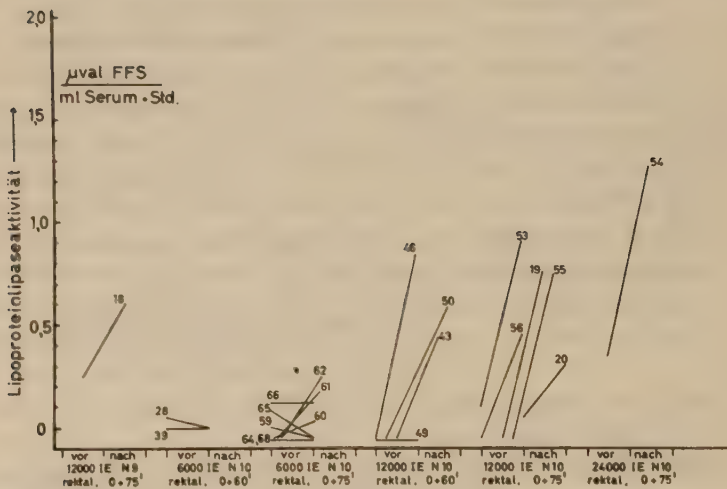


Abbildung 4.: Lipoproteidlipaseaktivität des Serums nach rectaler Verabreichung verschiedener Mengen der Präparate N 9 bzw. N 10. Blutentnahmen vor und 60 bzw. 75 Min. nach Heparin-Verabreichung.

Die freigesetzten Fettsäuren bei den positiv reagierenden Probanden lagen zwischen 0,08 und 0,29 µval FFS/ml · Std., im Mittel bei 0,036 µval FFS/ml · Std.

Da sich bei einem Patienten nach rectaler Verabreichung von 12000 IE N 9 jedoch eine Kläraktivitätssteigerung von 4,5 μ val FFS/ml $\cdot$ Std. fand (Abb. 4), wurden in weiteren Versuchen ebenfalls 12000 IE des Präparates N 10 verabreicht. Bei 4 Versuchspersonen wurde so in den nach 60 Min. abgenommenen Blutproben eine deutliche Kläraktivitätssteigerung gefunden (Tab. 5a, Abb. 4). Dabei war die Menge der freigesetzten Fettsäuren bei den 3 gesunden Probanden auf Werte zwischen 0,48 und 0,88 μ val FFS/ml $\cdot$ Std. erhöht, bei dem 4. Probanden, einem Patienten mit den Zeichen einer Rechtsherzinsuffizienz, trat dagegen keine Kläraktivitätssteigerung auf. Der Durchschnittswert der Kläraktivität bei den 4 Patienten betrug somit 0,498 μ val FFS/ml $\cdot$ Std. und war statistisch signifikant unterschiedlich gegenüber Null.

Wurde die Blutentnahme 75 Min. nach Verabreichung von 12000 IE N 10 vorgenommen, betrug die Kläraktivitätssteigerung bei den 5 Probanden zwischen 0,25 und 0,80 μ val FFS/ml $\cdot$ Std. (Tabelle 5b, Abb. 4). Die durchschnittliche Kläraktivitätssteigerung betrug 0,63 μ val FFS/ml $\cdot$ Std. und unterschied sich ebenfalls signifikant gegenüber Null.

Ein Versuch mit rectaler Applikation von 24000 IE N 10 ergab bei Blutentnahme 75 Min. nach Heparin-Verabreichung eine Kläraktivitätssteigerung von 0,92 μ val FFS/ml $\cdot$ Std. (Abb. 4).

Die Prüfung der Rekalzifizierungszeit nach HOWELL (nach der Beschreibung von JÜRGENS und BELLER 1959) ergab bei sublingualer bzw. rectaler Verabreichung des sauren Natrium-Heparin-Präparates N 10 bei 15 Patienten 60 Min. nach Verabreichung von 6000 IE einen Mittelwert der Differenz von -1,0 Sekunden (Tab. 6). Das bedeutet, daß das Präparat in dieser Dosierung auf die Blutgerinnung keinen mit dieser Methode faßbaren Einfluß hat, während es gleichzeitig lipämieklärend wirkt. Bei 6 Versuchspersonen, die 12000 IE N 10 rectal verabfolgt bekommen hatten und die Kontrollblutentnahmen nach 60 bzw. 75 Min.

nach Verabreichung erfolgten, betrug der Mittelwert der Differenz 9,67 Sekunden, ein statistisch signifikanter Unterschied gegenüber Null ließ sich nicht sichern ($0,70 > P > 0,60$, Tab. 7). Im Vergleich dazu fand sich nach intravenöser Verabreichung von 5000 IE Heparin (Liquemin "Roche") eine deutliche Verlängerung der Rekalzifizierungszeit auf über 10 Min.

6. Diskussion

Bei den beschriebenen Versuchen wurden zunächst fünf Versuche mit dem von SCHÖLL und KOPITZKI (1964) verwendeten sauren Heparin N 9 unternommen, um die eigene Arbeitstechnik überprüfen zu können. Dabei ließen sich Klärfaktoraktivitätssteigerungen feststellen, die im Mittel von 5 eigenen Versuchspersonen bei $0,314 \mu\text{val FFS/ml} \cdot \text{Std.}$ trotz eines Probanden ohne Kläraktivitätsanstieg lagen. Der mittlere Anstieg derselben bei den 7 von SCHÖLL und KOPITZKI (1964) untersuchten Probanden lag bei $0,467 \mu\text{val FFS/ml} \cdot \text{Std.}$ Diese Werte, beide gegenüber Null signifikant unterschiedlich, liegen, betrachtet man Maximal- und Minimalwerte, etwa im gleichen Bereich, sieht man von dem einen eigenen Patienten ohne Kläraktivitätsanstieg ab. Geringe Abweichungen zumal lassen sich unschwer durch eine individuell unterschiedliche Ablesung des Umschlagpunktes bei der Titration erklären.

Bei den 15 Versuchen, bei welchen den Probanden 6000 IE des Präparates N 10 sublingual verabreicht worden war, unterschied sich die Klärfaktoraktivität signifikant von Null. Die mittlere Kläraktivität lag aber mit $0,273 \mu\text{val FFS/ml} \cdot \text{Std.}$ deutlich niedriger als bei den eigenen Versuchen mit N 9 ($0,314 \mu\text{val FFS/ml} \cdot \text{Std.}$) bzw. denen von SCHÖLL und KOPITZKI ($0,467 \mu\text{val FFS/ml} \cdot \text{Std.}$). Die Zahl der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Probanden in dieser Reihe ist aber doppelt so groß wie in der zitierten von SCHÖLL und KOPITZKI. Nach Angabe der Firma ist die Heparinmenge in N 10 außerdem geringer als in N 9.

In den eigenen Versuchen wurde der Mittelwert der Kläraktivitätssteigerung noch dadurch beeinflusst, daß bei 4 der 15 Probanden keine Kläraktivitätssteigerung auftrat. Die Werte mit Kläraktivität lagen zwischen 0,04 und 0,92 pval FFS/ml . Std., etwa in dem von SCHÖLL und KOPITZKI angegebenen Bereich.

Aus den angeführten Fakten dürfte die Schlußfolgerung erlaubt sein, daß dieses getestete Präparat N 10 in dieser Dosierung bei sublingualer Verabreichung wohl etwa dem Präparat N 9 in seiner Wirkungsintensität gleichkommt. Bei der Steigerung der N 10-Dosis auf 12000 IE Heparin mit der Entnahme des Postheparinserums nach 60 Min. war wie bei SCHÖLL und KOPITZKI (1964) gegenüber 6000 IE Heparin keine Kläraktivitätssteigerung festzustellen. Wegen der vielen Versuchsergebnisse ohne Kläraktivitätssteigerung (6 von 15 Fälle) ließ sich auch ein signifikanter Unterschied gegenüber Null nicht sichern. Da zur Verabreichung der höheren N 10-Dosis die doppelte bzw. vierfache Tablettenzahl gegeben werden mußte, stellte sich bei der Mehrzahl der Probanden ein vermehrter Speichelfluß ein. Infolgedessen wurde möglicherweise ein mehr oder weniger großer Anteil der Wirksubstanz der sublingualen Resorption durch Verschlucken entzogen.

Bei der rectalen Verabreichung von 6000 IE N 10 mit Postheparinserum-Entnahmen nach 75 Min. steht die geringe, nicht signifikante Lipoproteidlipaseaktivitätserhöhung im Gegensatz zu den Ergebnissen von SCHÖLL und KOPITZKI (1964), die bei der gleichen Dosierung von N 9 höhere Aktivitätswerte als bei den sublingual durchgeführten Versuchen fanden.

Bei rectaler Applikation von 12000 IE N 10 mit Blutentnahmen 60 bzw. 75 Min. nach Heparingabe waren die Ergebnisse dagegen signifikant unterschiedlich gegenüber Null. Die durchschnittliche Kläraktivitäts-Zunahme lag über den bei sublingualer Verabreichung erzielten Werten. Demnach kann

eine bessere Resorption des Heparins bei rectaler Verabreichung gegenüber der sublingualen Applikation vermutet werden. SCHÖLL und KOPITZKI (1964) kamen bei der Untersuchung des Präparates N 9 zum gleichen Schluß.

Gegenüber den Ergebnissen der intravenösen Heparinverabreichung von 5000 IE mit einer mittleren Kläraktivitätssteigerung bei 4 Versuchen von $5,9 \mu\text{val FFS/ml} \cdot \text{Std.}$ fand sich eine Kläraktivitätssteigerung nach sublingual bzw. rectal verabreichten Heparindosen von etwa 5 - 11%, die Versuche mit 12000 IE sublingual und 6000 IE rectal verabreichten Heparin aus den genannten Gründen ausgenommen. SCHÖLL und KOPITZKI (1964) gaben im Vergleich zum intravenös verabreichten Heparin für das von ihnen untersuchte N 9 eine 15%ige klärfaktorsteigernde Wirksamkeit an, wobei u.a. aber zu bemerken ist, daß diese Autoren 6000 IE Heparin (Liquemin "Roche") verwandten und bei dem einen vorliegenden Versuch nur eine Kläraktivitätssteigerung von etwa $3,5 \mu\text{val FFS/ml} \cdot \text{Std.}$ in der Blutentnahme 10 Min. nach Injektion des Heparins als Maximalwert auftrat.

In den vorliegenden Versuchen konnte unter Dosen von mehr als 6000 IE sublingual verabreichten N 10 keine Kläraktivitätssteigerung gesichert werden. Dagegen fand sich bei rectaler Verabreichung von 12000 IE N 10 gegenüber einer Dosis von 6000 IE eine Kläraktivitätssteigerung. Ähnliche Maxima der Heparinwirkung stellten SCHÖLL und KOPITZKI (1964) sowohl bei sublingualer als auch bei rectaler Verabreichung fest. Bei intravenöser Verabreichung von mehr als 6000 IE Heparin konnte von einer Anzahl von Autoren analog keine Wirkungssteigerung festgestellt werden (FRENCH, ROBINSON, FLOREY 1953; GROSSMAN 1954; SAILER, SANDHOFER, BRAUNSTEINER 1961). Trotz dieses gleichen Maximalwertes bei beiden Applikationsarten unterscheiden sich die absoluten Kläraktivitäten im Serum erheblich, wie aus dem Beschriebenen hervorgeht.

Nach sublingualer Verabreichung von Kalium-Heparin hatten eine Reihe von Autoren eine Kläraktivität im Serum nachweisen können (FULLER 1958, 1960; BERKOWITZ, LIKOFF und SPITZER 1959; SHAFTEL und SELLMAN 1959; HIRSHLEIFER und NAYAK 1961). Diese Autoren gaben 1500 bis 4500 IE Kalium-Heparin. Mit höheren Dosierungen konnten auch bei diesem Heparinpräparat keine stärkere Kläraktivitätssteigerung herbeigeführt werden. HEYMANN (1961) sowie SCHÖLL und KOPITZKI (1964) fanden nach Kalium-Heparin keine signifikante Kläraktivitätsänderung. SCHÖN und BRAUNE (1963) sowie SCHÖN und SAUER (1963) konnten bei der Prüfung von sublingual verabreichtem Natrium-Heparin sowohl mit dem J^{131} -Fettklärtest als auch mit der Bestimmung freigesetzter Fettsäuren im Serum bei einer Dosierung von 6000 bis 9000 IE über keine positiven Ergebnisse berichten. Die in den vorliegenden Untersuchungen gefundene Kläraktivität nach sublingualen und rectalen Gaben des sauren Heparin-Präparates N 10 dürfte auf die verbesserte Resorption des chemisch veränderten Heparins zurückzuführen sein. Gegenüber dem von SCHOLL und KOPITZKI (1964) aus Reinheparin hergestellten sauren Heparin-Präparat N 9 kann mit dem aus Rohheparin gefertigten N 10 keine stärkere Klärfaktoraktivierung festgestellt werden. Die nachgewiesene wenn auch gegenüber der intravenösen Applikation unveränderten Heparins viel geringere lipämieklärende Wirkung sauren Heparins eröffnet möglicherweise therapeutische Möglichkeiten. Hier sind vor allem die Langzeitbehandlungen bei der Myocardinfarktnachsorge zur Verhinderung eines Reinfarktes mit parenteral verabreichtem Heparin von ENGELBERG und Mitarbeitern (1956, 1960) und mit sublingualem Kalium-Heparin von FULLER (1960) richtungsweisend. Erstere fanden eine mittlere Mortalität von 3,1% bei 5 Jahre dauernder durchschnittlicher Behandlungszeit gegenüber 11,5% bei der PLAZEBO-Gruppe, ein statistisch signifikante unterschiedliches Ergebnis.

FÜLLER erreichte mit 3 x 1500 bis 4000 IE sublingual eine statistisch gesicherte, geringere Reinfarktquote gegenüber einer Kontrollgruppe, trotz der im in vivo- bzw. im in vitro-Einzelversuch nicht sicher nachzuweisenden Kläraktivitätssteigerung. Noch ausstehende Langzeitversuche mit sublingual verabreichtem saurem Natrium-Heparin müßten zeigen, ob die Reinfarktquote mit diesem Präparat ebenfalls gesenkt werden könnte.

Bei der Angina pectoris beschrieben LORENZINI und Mitarbeiter (1957) bei täglicher 3 x 1500 bis 3000 IE Heparin-gabe sublingual sowie ALBRIEUX und Mitarbeiter (1957) therapeutische Erfolge. Letztere berichteten auch über angebliche günstige Erfolge bei der Infarktprophylaxe und bei sekundären Hyperlipämien. Nach dem angegebenen Wirkungsgrad sublingual verabreichten Natrium-Heparins gegenüber dem intravenösen dürften Behandlungsversuche aber nur bei geringgradigen Hyperlipämien erfolgversprechend sein.

Das gleiche gilt auch für die Behandlung essentieller Hyperlipämien. HEYMANN (1961) gibt für diese an, daß die für eine ausreichende Serumlipoidsenkung zur Anfangsbehandlung notwendigen Heparinmengen sehr unterschiedlich sind und bis zu 20000 IE intravenös applizierten Heparins betragen können. Daher wäre ein Therapieeffekt von sublingual oder rectal zugeführtem Heparin nur bei entweder gutem Ansprechen der Serumlipide auf Heparin oder nach initialer Senkung derselben mit größeren intravenösen Heparindosen bei der Langzeittherapie in Form einer "Erhaltungsdosis" zu erwarten.

Ob im Körper ein Speicherungseffekt des verabfolgten Heparins, eine gesteigerte Klärfaktorbildung oder eine Neutralisation körpereigener Inhibitoren Ursache der beschriebenen Wirkung ist wird diskutiert, nachdem HEYMANN (1961) berichtet hatte, daß nach Absetzen einer parenteralen Heparin-Therapie die Senkung der Serumlipide über einen längeren Zeitraum erhalten blieb. Würde man

einen oder mehrere der 3 genannten Faktoren bestätigen können, wäre das eine Erklärung für die offensichtliche Wirkung sublingual über lange Zeit verabreichten Kalium-Heparins trotz nicht sicher nachweisbarer Sofortwirkung (FULLER 1960).

Bei einer Heparin-Dauertherapie, während der 2 x wöchentlich 200 mg Heparin intramusculär verabreicht wurden, hatten ENGELBERG und Mitarbeiter (1956) in 5 - 10% eine verlängerte Blutungszeit festgestellt. Wie von mehreren Autoren beschrieben und durch die hier vorgelegten Untersuchungen bestätigt wurde, bleibt der Gerinnungsvorgang bei der sublingualen und rectalen Applikationsform im Gegensatz zur intravenösen und intramusculären unbeeinflusst (HEYMANN 1961, SCHÖLL und KOPITZKI 1964). Aus der unterschiedlichen Klär- bzw. Gerinnungsaktivität kann man folgern, daß beide Wirkungsmechanismen voneinander unabhängig sind. Dies konnte durch ZÖLLNER, ROTHMUND und SEITZ (1954) belegt werden, die das Heparinmolekül enzymatisch so sehr veränderten, daß es nur noch klär- aber nicht mehr gerinnungsaktiv wirkte. SCHÖLL und KOPITZKI (1964) vermuteten deshalb verschiedene Wirkungsformen des Heparins je nach der Verabreichungsart.

7. Zusammenfassung

Es wurde anhand einer Literaturübersicht das durch Heparin aktivierbare, im Serum auftretende Enzym Lipoproteidlipase (Klärfaktor), dessen Eigenschaften und die Klärreaktion beschrieben. Mittels der titrimetrischen Bestimmung der durch dieses Enzym aus den Serum-Tri-glyzeriden freigesetzten Fettsäuren nach DOLE (1956), modifiziert nach SCHÖLL und KOPITZKI (1964), wurde der statistisch signifikante Nachweis erbracht, daß ein zur besseren Resorbierbarkeit durch die Mundschleimhaut aus Rohheparin hergestelltes saures Natrium-Heparin (N 10) lipolytisch wirkt. 6000 IE saures Natrium-Heparin er-

gaben gegenüber höherer Dosierung die stärkste Kläraktivität. Bei rectaler Verabreichung desselben Präparates ließ sich ebenfalls eine klärfaktoraktivierende Wirkung sichern.

Insgesamt dürfte das Präparat N 10 etwa die gleiche Klärwirksamkeit besitzen wie ein aus Reinheparin hergestelltes saures Natrium-Heparin N 9. Auf Grund der gesicherten Klärfaktoraktivierung saurer Natrium-Heparin-Präparate werden Langzeitbehandlungen bei Myocardinfarkt - und Angina pectoris - Patienten sowie bei Kranken mit Hyperlipämie vorgeschlagen.

Versuch-Nr.
Alter
Geschlecht

Klaraktivität
vor
nach
Heparin-
gabe
 x_1

Diagnose

x_2

D

M_D

D^2

s^2

s

s_M

t

P

14	35	w.	Hypertonie	0,0	0,24	0,24	0,0576						
17	18	w.	Adnexitis	0,24	0,57	0,33	0,1089						
21	29	w.	Ungekl. Sen- kungsbe- schleunigung	0,0	0,39	0,39	0,1521	0,494	0,2223	0,0994	3,159	0,05	$P > 0,02$
22	30	w.	Adnexitis	0,0	0,61	0,61	0,3721						
23	45	m.	Hypertonie	0,0	0,0	0,0	0,0						
						1,57	0,6907						

n = 5

Tabelle 1: Bestimmung der Klaraktivität nach Verabreichung
von 6000 IE saurem Natrium-Heparin N 9 sublingual,
Blutentnahmen vor und 60 Min. nach Verabreichung
der Testsubstanz.

Versuchs-	Alter	Geschlecht	Diagnose	Kläranktivität vor nach Heparin- gabe	x_1	x_2	D	M_D	D^2	s^2	s	s_M	t	P
26	72	m.	Bronchial-Ca.	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0					
27	15	m.	Osteoporose	0,01	0,34	0,33	0,109							
29	57	w.	Anämie	0,0	0,76	0,76	0,578							
30	60	m.	Hypertonie	0,01	0,39	0,38	0,144							
31	70	w.	Tumor mit Metastasen	0,0	0,0	0,0	0,0							
32	62	w.	Morb.Walden- ström	0,04	0,35	0,31	0,096							
33	43	w.	Pleuritis	0,0	0,17	0,17	0,029							
34	68	w.	Ulcus ventr.	0,24	0,28	0,04	0,273	0,002	0,1059	0,3253	0,084	3,25	0,01	P<0,001
35	58	w.	Uramie	0,0	0,25	0,25	0,063							
36	59	w.	Morb.Boeck	0,09	0,33	0,24	0,058							
37	36	w.	Morb.Hodgkin	0,12	0,30	0,18	0,032							
38	21	m.	Morb.Hodgkin	0,03	0,81	0,78	0,608							
40	49	w.	unbekannt	0,20	0,04	-0,16	0,026							
41	68	w.	Kyokardinf. Wallenberg	0,10	0,0	-0,10	0,010							
42	65	w.	Syndrom	0,0	0,92	0,92	0,846							
n =	15				4,10	2,601								

Tabelle 2: Bestimmung der Kläraktivität nach Verabreichung von 6.000 IE sauren Natrium-Heparin N 10 sublingual, Blutentnahmen vor u. 60 Min. nach Heparin-gabe.

Versuch-Nr.	Alter	Geschlecht	Diagnose	x_1	x_2	D	M_D	D^2	s^2	s	s_M	t	P
44	27	w.	gesund	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0					
45	23	w.	gesund Paroxysm.	0,55	0,90	0,35	0,1225						
51	61	w.	Tachykardie	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0					
52	52	w.	Pankreaszyste	0,10	0,12	0,02	0,00						
67*	55	m.	Status nach Hirntumorop.	0,0	0,71	0,71	0,5041						
69	62	m.	Ulcus ventr. Lungenemphys.	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0					
70	57	m.	Polyglobulie	0,08	0,11	0,03	0,0009						
71a*33		m.	Morb. Bürger	0,03	0,70	0,67	0,122	0,4489	0,062	0,245	0,0632	1,930	0,10>P>0,05
72* 57		m.	Herzinsuffi- zienz	0,14	0,17	0,03	0,0009						
74*		w.	unbekannt	0,12	0,0	-0,12	0,0144						
75* 49		w.	gesund	0,0	0,08	0,08	0,0006						
76* 68		m.	Hypertonie	0,01	0,06	0,05	0,0003						
78* 28		w.	gesund	0,0	0,01	0,01	0,0001						
79* 37		m.	gesund	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0					
71b*33		m.	Morb. Bürger	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0					
= 15						1,83		1,093					

Versuch-Nr.	Alter	Geschlecht	Diagnose	Klaraktivität vor Heparin- gabe x_1	Klaraktivität nach Heparin- gabe x_2	D	M_D	D^2	s^2	s	s_M	t	P
28	24	m.	gesund	0,05	0,0	-0,05		0,0003					
39	23	m.	gesund	0,0	0,0	0,0		0,0					
59	72	m.	Zust.nach Prostatak- tomie	0,05	0,0	-0,05		0,0003					
60	65	m.	Herzinsuff. Stenokardien	0,0	0,08	0,08		0,0006					
61		m.	Verdacht auf Pankreatitis	0,0	0,22	0,22		0,0484					
62	60	m.	Flush Syndrom	0,0	0,29	0,29	0,036	0,0841	0,0024	0,49	0,155	0,2322	0,97P>0,8
64	50	m.	chron.Hepa- titis	0,0	0,0	0,0		0,0					
65	55	m.	Paroxysmale Tachykardie	0,13	0,0	-0,13		0,0169					
36	42	m.	Hypertonie, flücht.apopl. Insult	0,17	0,17	0,0		0,0					
$\frac{68}{n = 10}$	70	m.	polycyth.vera	0,0	0,0	$\frac{0,0}{0,36}$		$\frac{0,0}{0,151}$					

Tabelle 4:

Bestimmung der Klaraktivität nach Verabreichung von 6000 IE sauren Natrium-Heparin N 10 rektal, Blutentnahmen vor und 75 Min. nach der Verabreichung des Heparins, bei Versuch 28 und 39 60 Min. nach der Verabreichung des Heparins.

Kläraktivität
vor
Heparin-
gabe

Diagnose

x_1

x_2

D

M_D

D^2

s^2

s

s_M

t

P

Tab. 5a)	43	23	m.	gesund	0,0	0,48	0,48	0,230											
	46	22	m.	gesund	0,0	0,88	0,88	0,774											
	49	60	m.	Rechtsherz- insuffiz.	0,0	0,0	0,0	0,498	0,0	0,1367	0,3696	0,0924	5,390	0,02	P>0,01				

	50	23	m.	gesund	0,0	0,63	0,63	1,397											
n =	4						1,99	1,401											

Tab. 5b)	19	55	w.	Pyelitis	0,0	0,80	0,80	0,640											
	20	48	w.	Hypothy- reose	0,1	0,35	0,25	0,063											

	53	69	w.	Arterio- sklerose	0,16	0,95	0,79	0,626	0,624	0,0605	0,2459	0,12295	5,092	0,01	P>0,001				
--	----	----	----	----------------------	------	------	------	-------	-------	--------	--------	---------	-------	------	---------	--	--	--	--

	55	25	m.	Verdacht auf Virus- hepatitis	0,0	0,79	0,79	0,624											
--	----	----	----	-------------------------------------	-----	------	------	-------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

	56	18	m.	Juv. Hyper- tonie	0,0	0,50	0,50	0,250											
n =	5						3,13	2,201											

Tab. 5a) und 5b): Bestimmung der Kläraktivität nach Verabreichung von 12.000 IE saurem Natrium-Heparin N 10 rektal, Blutentnahmen vor und 60 Min. (Tab. 5a) bzw. 75 Min. (Tab. 5b) nach Verabreichung der Testsubstanz

Vers.	x_1	x_2	D	M_D	D^2	s^2	s	s_M	t	ρ
25	172	195	+23							
26	165	120	-45							
27	127	180	+53							
28	127	165	+38							
30	172	150	-22							
31	150	120	-30							
32	97	120	+23							
33	187	135	-52	-1,0						
35	240	255	+15							
36	142	210	+68							
37	135	195	+60							
38	255	240	-15							
40	360	240	-120							
41	172	180	+8							
$\Sigma = 15$	195	172	-23							
$\Sigma = 19$										

Tabelle 6: Bestimmung der Rekalzifizierungszeit nach
 HOWELL nach Verabreichung von 6000 IE N 10
 sublingual, Blutentnahmen vor und 60 Min.
 nach Verabreichung des Heparin .

Vers.	x_1	x_2	D	M_D	D^2	s^2	s	s_M	t	P
43	180	142	-38		1584					
46	202	215	+13		169					
49	187	270	+83		6889					
50	225	210	$\frac{-15}{+43}$	9,67	225	1707	42	17,4	0,556	$0,70 > P > 0,60$
53	90	105	+15		225					
55	115	195	0		0					
$n = 6$			+58		9092					
=====			=====		=====					

Tabelle 7: Bestimmung der Rekalfizifizierungszeit nach HOWELL
nach Verabreichung von 12000 IE N 10 rektal,
Blutentnahmen vor und nach 60 bzw. 75 Min. nach
Verabreichung des Heparins.

Literaturverzeichnis

1. ALBRIEUX, A.S., ROCA, F., ESTEFAN, J.C.: Uso de la heparina el tratamiento y prevención de la arteriosclerosis. *Dia. méd. (B. Air)*, 29, 26-28 (1957).
2. ALBRINK, M.J., MAN, E.B., PETERS, J.P.: The relation of neutral fat to lactescence of serum. *J. Clin. Invest.*, 34, 147-157 (1955).
3. ANDERSON, N.G., FAWCETT, B.: An antichylomicronemic substance produced by heparin injection. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)*, 74, 768-771 (1950).
4. ANFENSEN, C. B., BOYLE, E., BROWN, R.K.: The role of heparin in lipoprotein metabolism. *Science*, 115, 583-586 (1952).
5. ANFENSEN, C. B.; On the role of lipemia clearing factor in lipid transport. Aus: "Fat Metabolism" edited by V.A. Najjar, Baltimore (1954).
6. ANFENSEN, C.B.: Biochemical aspects of atherosclerosis. *Fed. Proc.*, 15, 894 (1956)
7. ANTONINI, F.M., SALVINI, L.: Mucopolysaccharides, "clearing factor" age and atherosclerosis. *Bull. Schweiz. Akad. med. Wiss.*, 13, 209-228 (1957).
8. AUERSWALD, W., DOLESCHIEL, W.: Möglichkeiten der Beurteilung von Wirkungen des Lipoproteidlipase-Systems mit Hilfe der Flotationsanalyse. *Bibl. haemat. Basel*, 15, 34-37 (1963).
9. ASELIUS (1622) zitiert nach GAGE, S.H. und FISH, P.A. (1924).
10. BAKER, S.P.: A standardized in vitro method for evaluation of clearing factor response in man: its application to an agewise study. *Circulation*, 14, 496-497 (1956).
11. BAKER, S.P.: Heparin-activated clearing factor. *Circulation*, 15, 889-896 (1957).
12. BASKYS, B., KLEIN, E., LEVER, W.F.: Lipases of blood and tissues. I. Purification and properties of heparin-induced plasma lipase. *Arch. Biochem.*, 99, 25-30 (1962).
13. BASKYS, B., KLEIN, E., LEVER, W.F.: Lipases of blood and tissues. II. Kinetic studies on heparin-induced plasma lipase. *Arch. Biochem.*, 99, 31-35 (1962).

- 1. BECKER, G.H., MEYER, J., NECHELES, H.: Fat absorption in young and old age. *Gastroenterology*, 14, 80-92 (1950).
- 2. BECKER, G.H., RALL, Th.W., GROSSMANN, M.J.: Effect of heparin on the distribution of intravenously administered C^{14} labeled soybean oil emulsion in rats. *J. Lab. clin. Med.*, 45, 786-791 (1955).
- 3. BERKOWITZ, D., LIKOFF, W. and SPITZER, J.J.: The effect of sublingual heparin and lipid partition and radioactive fat tolerance. *Clin. Res. Proc.*, 7, 255 (1959).
- 4. BIANCHINI, P.: Su di un eparinoide della mucosa duodenale. I. Metacromasia ed acidi uronici. *Boll. Soc. ital. Biol. sper.*, 34, 685-688 (1958).
- 5. BONO, F., CORTINOVIS, R.: Risultati clinici dell'associazione lipocalc-eparina nei soggetti arteriosclerotici e modificazioni fisicochimiche delle lipoproteine serici. *Minerva chr. (Torino)*, 10, 685-688 (1966).
- 6. BOYLE, E., BRAGDON, J.H., BROWN, R.K.: Role of heparin in invitro production of α -lipoproteins in human plasma. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)*, 81, 475-477 (1952).
- 7. BRAGDON, J.H., HAVEL, R.J.: In vivo effect of anti-heparin agents on serum lipids and lipoproteins. *Amer. J. Physiol.*, 177, 128-133 (1954).
- 8. BRAGDON, J.H., GORDON, R.S.: Tissue distribution of C^{14} after the intervenous injection of labeled chylomicrons and unesterified fatty acids in the rat. *J. clin. Invest.*, 37, 574-578 (1958).
- 9. v. BRAND, V., DRESCHER, H., ZÖLLNER, N.: Über die Verwertung parenteral zugeführter Fetemulsionen und ihre Beeinflussung durch Heparin. *Nutritio et Dieta*, 1, 161-176 (1959).
- 10. BRAUNSTEINER, H., HÖFER, R., THUMB, N., VETTER, H.: Untersuchungen über die basophilen Leukozyten bei Schilddrüsenkrankheiten. *Klin. Wschr.*, 37, 250-252 (1959).
- 11. BRAUNSTEINER, H., SAILER, S., SANDHOFER, F.: Untersuchungen über die Lipoproteidlipase. IV (Vergleichende Untersuchungen über endogene Lipoproteidlipase-Aktivität im Plasma von Menschen, Ratten und Kaninchen). *Wien. klin. Wschr.*, 73, 815-817 (1961).

25. BRAUNSTEINER, H., SAILER, S., SANDHOFER, F.: Activité spontanée de la lipoprotéinelipase dans le plasma humain.
Nouv. Rev. franc. Hémat., 3, 647-652 (1963).
26. BRAUNSTEINER, H., THUMB, N.: Mastzellen, Basophile und Heparinfreisetzung.
Bibl. haemat. (Basel), 15, 9-15 (1963).
27. BROWN, W.D.: Protamine, chylomicrons and clot formation.
Science, 118, 46-47 (1953).
28. CAIRNS, A., and CONSTANTINIDES, P.: Mast cells and atherosclerosis.
Science, 119, 120, 31 (1954).
29. CAPRARO, V., CANTONE, A., CRESSERI, A.: Über die Anwesenheit einer resorbierbaren, mit "Clearing"-Vermögen versehenen Substanz im normalen Magensaft.
Naturwissenschaften 43, 36-37 (1956).
30. CARLSON, L.A. and WADSTRÖM, L.B.: Studies on the glycerides during the clearing reaction.
Clin. Chem. Acta, 2, 9-15 (1957).
31. CHARGAFF, E., ZIFF, M., MOORE, D.H.: Studies on chemistry of blood coagulation; elektrophoretic study of effect of anticoagulants on human plasma proteins, with remarks on separation of heparin complement.
J. Biol. Chem., 139, 383-405 (1941).
32. CHERKES, A., GORDON, R.S. jr.: The liberation of lipoproteinlipase by heparin from adipose tissue incubated in vitro.
J. Lipid Res., 1, 97-101 (1959).
33. CONSTANTINIDES, P.: Mast cells and susceptibility to experimental atherosclerosis.
Science, 117, 505-506 (1953).
34. CONSTANTINIDES, P., SZASZ, G. and HARDER, F.: Retardation of atheromatosis and adrenal enlargement by heparin in the rabbit.
Arch. Path. (Chicago), 56, 36-45 (1953).
35. CONSTANTINIDES, P., SAUNDERS, P.: Effect of sulfated polysaccharides on preestablished atherosclerosis in the presence of continued cholesterol feeding.
Circulation, 14, 481 (1956).
36. DAVIS, B., DUBOS, R.: Interaction of serum albumin, free and esterified oleic acid and lipase in relation to cultivation of the tubercle Bacillus.
Arch. Biochem., 11, 201-203 (1946).

37. DOLE, V.P.: A relation between non-esterified fatty acids in plasma and the metabolism of glucose.
J. clin. Invest., 35, 150-154 (1956).
38. EGGSTEIN, M.: Die Wechselbeziehungen zwischen Lipolyse und Antithrombinaktivität im Plasma nach Heparin (-oiden).
Bibl. haemat. (Basel), 15, 84-99 (1963).
39. EIBER, H.B., DANISHEFSKY, J., CARR, J.J.: Quantitative studies on the clearing effect of heparin.
J.Amer. med. Ass., 176, 871-873 (1961).
40. ENGELBERG, H.: Further studies of human circulating plasma heparin levels. Correlation with serum lipids and lipoproteins.
Circulation, 8, 448 (1953).
41. ENGELBERG, H., MASSEL, T.B.: Heparin in the treatment of advanced peripheral atherosclerosis.
Amer. J. med. Sci., 225, 14-19 (1953).
42. ENGELBERG, H.: Studies of normal endogenous lipemia clearing factor.
Circulation, 10, 590 (1954) and Amer. J. Physiol., 181, 309 (1955).
43. ENGELBERG, H.: Correlation of plasma heparin levels and serum low density lipoproteins.
Circulation, 10, 604 (1954).
44. ENGELBERG, H., KUHN, R.: Studies of arteriovenous oxygen differences in atherosclerotic individuals before and after heparin.
Circulation, 10, 604 (1954).
45. ENGELBERG, H.: Correlation of plasma heparin levels with serum lipoproteins.
Acta med. scand., 151, 161-166 (1955).
46. ENGELBERG, H., KUHN, R., STEINMAN, M.: A controlled study of the effect of the intermittend heparin therapy on the course of human coronary atherosclerosis.
Circulation, 13, 489-498 (1956).
47. ENGELBERG, H.: Human endogenous lipemia clearing activity - observations in 482 individuals.
Circulation, 18, 495 (1958).
48. ENGELBERG, H.: Buccal and sublingual administration of heparin potassium (Clarín).
J.Amer. med. Ass., 169, 1322-325 (1959).

49. ENGELBERG, H., KUHN, R.: Long-term observations of intermittent heparin therapy for the prevention of coronary atherosclerosis. *Circulation*, 22, 745 (1960).
50. ENGELBERG, H.: Plasma heparin levels: Normal values and correlation with serum cholesterol and low-density lipoproteins. *Circulation*, 22, 745 (1960).
51. ENGELBERG, H.: Studies of human serum and plasma inhibition of lipase activity of post-heparin clearing factor. *Amer. J. clin. Path.*, 38, 367-370 (1962).
52. FIELD, J.B.; RAMSAY, G.D., ATTYAH, A.M., STARR, P.: The effect in man of a new heparinoid, Treburon. *J. Labor. clin. Med.*, 41, 208-214 (1953).
53. FISCHER, A., ASTRUP, T.: On administration of heparin per os. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)*, 42, 81-82 (1939).
54. FODOR, J., ZEMPLENYI, T., LOJDA, Z., FABRY, P.: The role of mast cells in lipid metabolism. *Rev. Czech. Med.*, 8, 133-136 (1962).
55. FOSTER, A.B., HUGGARD, A.J.: The chemistry of heparin. *Advanci Carbohyd. Chem.*, 10, 332-368 (1955).
56. FRAZER, A.C., STEWART, H.C.: Ultramicroscopic particles in normal human blood. *J. Physiol. (London)*, 90, 18-30 (1937).
57. FRAZER, A.C.: Normale und gestörte Fettresorption. *Medizinische* 1317-1321 (1953).
58. FREDRICKSON, D.S.: Some biochemical aspects of lipid and lipoprotein metabolism. *J. Amer. med. Ass.*, 164, 1895-899 (1957).
59. FREDRICKSON, D.S., GORDON, R.S., ONO, K., CHERKES, A.: The metabolism of albumin bound C¹⁴-labeled unesterified fatty acids in normal human subjects. *J. clin. Invest.*, 37, 1504-1515 (1958).
60. FREEMAN, L., ENGELBERG, H., DUDLEY, A.: Plasma heparin levels. *Amer. J. clin. Path.*, 24, 599-606 (1954).
61. FRENCH, J.E., ROBINSON, D.S., FLOREY, H.W.: The effect of the intravenous injection of heparin in the interaction of chyle and plasma in the rat. *Quart. J. exp. Physiol.*, 38, 101-111 (1953).
62. FULLER, H.L.: Sublingual heparin in hyperlipemia. *Angiology*, 9, 311-313 (1958).

63. FULLER, H.L.: Effect of sublingual heparin on lipemia clearing and on recurrence of myocardial infarction.
Angiology, 11, 1-7 (1960).
64. GAGE, S.H., FISH, P.A.: Fat digestion, absorption and assimilation in man and animals as determined by darkfield microscope and a fat-soluble dye.
Amer. J. Anat., 34, 1 - 77 (1924).
65. GATES, H.S., GORDON, R.S., jr.: Demonstration of lipoprotein lipase in fasting human serum.
Fed. Proc., 17, 437 (1958).
66. GILBERT, N.C., NALEFSKI, L.A.: The effect of heparin and dicumarol in increasing coronary flow volume.
J. Lab. clin. Med., 34, 797-805 (1949).
67. GOFMAN, J. W.; LINDGREN, F.T., ELLIOTT, H.J.: Ultracentrifugal studies of lipoproteins of human serum.
J. biol. Chem., 179, 973-979 (1949).
68. GOFMAN, J.W., LINDGREN, F., ELLIOTT, H., MANTZ, W., HEWITT, J. STRISOWER, B., HERRING, V.: The role of lipids and lipoproteins in atherosclerosis.
Science, 111, 166-171, 186 (1950).
69. GOFMAN, J.W., JONES, H.B., LINDGREN, F.T., LYON, T.P., ELLIOTT, H.A., STRISOWER, B.: Blood lipids and human atherosclerosis.
Circulation, 2, 161-178 (1950).
70. GORDON, R.S., BOYLE, E., BROWN, R., CHERKES, A., ANFINSEN, Ch. B.: Role of serum albumin in lipemia clearing reaction.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.), 84, 168-170 (1953).
71. GORDON, R.S.: Interaction between oleate and the lipoproteins of human serum.
J. Clin. Invest., 34, 477-484 (1955).
72. GORDON, R.S., CHERKES, A.: Unesterified fatty acids in human blood plasma.
J. clin. Invest., 35, 206-212 (1956).
73. GORE, J., LARKEY, B.J.: Functional activity of arterial mucopolysaccharides.
Circulation, 20, 976 (1959).
74. GRAHAM, D.M., LYON, T.P., GOFMAN, J.W., JONES, H.B., YANKLEY, A., SIMMONTON, J., WHITE, W.: Blood lipids and human atherosclerosis.
II. Influence of heparin upon lipoprotein metabolism.
Circulation, 4, 666-673 (1951).
75. GROSSMAN, M.J.: The effect of heparin on the fate of intravenously administered fat emulsions.
Journ. Lab. clin. Med., 40, 805-806 (1952).

76. GROSSMAN, M.J.: The quantitative measurement of heparin-induced lipemia clearing activity of plasma. J. Lab. clin. Med., 43, 445-451 (1954).
77. GROSSMAN, J.J., STRUB, J.: Effect of heparin on fate of intravenously administered fat emulsion in rats. Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.), 85, 356-359 (1954).
78. GROSSMAN, M.J., PALM, L., BECKER, G.H., MOELLER, H.C.: Effect of lipemia and heparin on free fatty acid content of rat plasma. Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.), 87, 313-315 (1954).
79. GROSSMAN, M.J., STADLER, J., CUSHING, A., PALM L.: Relation of lipolysis to deturbidification and returbidification in heparin-induced lipemia-clearing phenomenon. Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.), 88, 132-135 (1955).
80. GUBSER, J.: Zur Heparinbehandlung der Angina pectoris. Medizinische, 1190-1192 (1956).
81. HAENSCH, R.: Heparin-Therapie und Klinik der idiopathischen, hyperlipämischen Xanthomatose. Arch. klin. exp. Derm., 205, 512-525 (1958).
82. HAENSCH, R.: Hyperlipämische Xanthomatose und Heparin-körper-Therapie. Med. Klin., 55, 2246-2249 (1960).
83. HAHN, P.F.: Abolishment of alimentary lipemia following injection of heparin. Science, 98, 19-20 (1943).
84. HARTMANN, G.: Methode der Lipoprotein-Lipase-Bestimmung: Fettsäuren-Titration. Bibl. haemat. (Basel), 15, 25-30 (1963).
85. HARTMANN, G.: Lipoproteidlipase und Atherosklerose. Bibl. haemat. (Basel), 15, 127-31 (1963).
86. HARTMANN, G., STAUB, H.: Klärfaktormangel bei coronarer Atherosklerose. Cardiologia, 40, 245-251 (1962).
87. HAUSCHILD, F.: Pharmakologie und Grundlagen der Toxikologie. Georg Thieme Leipzig 1960, S. 488 f.
88. HOWELL, R.J., BOYLE, E.: Production of lipemia clearing factor during anaphylactoid shock. Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.), 85, 468-472 (1954).
89. HAVEL, R.J., BRAGDON, J.M.: Heparin-like activity of polymetaphosphate. Circulation, 10, 591, (1954).

90. HAVEL, R.J., FREDRICKSON, D.S.: The metabolism of chylomicra. I. The removal of palmitic acid-1-C¹⁴ labeled chylomicra from dog plasma. J. clin. Invest., 35, 1025-1032 (1956).
91. HAVEL, R.J., PETERSON, M.: Lipoprotein lipase in blood plasma of men with coronary heart disease. Circulation, 18, 496 (1958).
92. HERZSTEIN, J., WANG, CHUN-J., ADLERSBERG, D.: Fat loading studies in relation to age. Circulation, 8, 450 (1953).
93. HERZSTEIN, J., WANG, CHUN-J., ADLERSBERG, D.: Effect of heparin on plasma lipid partition in man: Studies in normal persons and in patients with coronary atherosclerosis, nephrosis, and primary hyperlipemia. Ann. Intern. Med., 40, 290-306 (1954).
94. HEWSON 1774, zitiert nach GAGE, S.H. and FISH, P.A. Amer. J. Anat. 34, 1 - 77 (1924).
95. HEYMANN, W.: Zur langfristigen Heparinbehandlung der Arteriosklerose und der essentiellen Hyperlipämie. Internist, 2, 140-154 (1961).
96. HEYMANN, W.: Zur oralen Behandlung mit Heparin und Heparinoiden. Bibl. haemat. (Basel), 15, 132-139 (1963).
97. HIRSHLEIFER, J., NAYAK, R.: Lipemia clearing effect of buccally administered heparin-potassium (Clarín). Science, 241, 645-649 (1961).
98. HOLLET, H., MENG, H.C.: Purification and characterisation of the lipemia clearing factor of postheparin plasma. Biochim. biophys. Acta, 20, 421-422 (1956).
99. HOLLISTER, L.E., KANTER, S.L.: Essential hyperlipaemia treated with heparin and with chlorpromazine. Gastroenterology, 29, 1069-1076 (1955).
100. HOWELL, R.J.: Bestimmung der Rekalzifizierungszeit nach: "Klinische Methoden der Blutgerinnungsanalyse" JÜRGENS, J., BELLER, F.K. Georg Thieme Stuttgart, S. 300-301 (1959).
101. INDERBITZIN, Th.: Experimentelle Untersuchungen zur Frage der antilipämischen Wirkung von Heparin. Schweiz. med. Wschr., 84, 1150-1154 (1954).
102. ISELIN, B., SCHULER, W.: Über die Einwirkung von Heparin auf Lipoprotein-Lipase (Clearing-factor) aus Gewebe. Helv. physiol. pharmacol. Acta, 15, 14-24 (1957).

103. JAHNKE, K., SCHILD, W.: Untersuchungen über die Beeinflussung des Serum-Fettspiegels bei der essentiellen Hyperlipämie.
Arztl. Wschr., 13, 572-575 (1958).
104. JEFFRIES, G.H.: The sites at which plasma clearing activity is produced and destroyed in the rat.
Quart. J. exp. Physiol., 39, 261-270 (1954).
105. JOBST, H.: Die Chylomikronen des Blutes.
Klin. Wschr., 33, 746-750 (1955).
106. JONES, H.B., GOFMAN, J.W., LINDGREN, F.T., LYON, Th. P., GRAHAM, D.M., STRISOWER, B., NICHOLS, A.V.: Lipoproteins in Atherosclerosis.
Amer. J. Med., 11, 358-379 (1951).
107. KERN, F.jr., SANDERS, B.B.: Lipoprotein lipase activity in clinical and experimental liver disease.
Gastroenterology, 40, 553 (1961).
108. KERN, F., STEINMANN, L., SANDERS, B. B.: Measurement of lipoproteinlipase activity in postheparin plasma: description of technique.
J. Lipid. Res., 2, 51-57 (1961).
109. KÖNIG, E., SEITZ, W., ZÖLLNER, N.: Die Hemmung der Lipämieklärungsreaktion durch Heparin.
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., 314, 177-181 (1959).
110. KORN, E.D.: Studies on clearing factor, a lipoprotein lipase.
Circulation, 10, 591-592 (1954).
111. KORN, E.D.: Clearing factor, a heparin activated lipoproteinlipase. I. Isolation and Characterisation of the enzymes of the normal rat-heart.
J. biol. Chem., 215, 1-14 (1955).
112. KORN, E.D.: Clearing factor, a heparin activated lipoproteinlipase. II. Substrate specificity and activation of coconut oil.
J. Biol. Chem., 215, 15-26 (1955).
113. KORN, E.D.: Partial inactivation of lipoprotein lipase by bacterial "heparinase".
Science, 124, 489 (1956).
114. KORN, E.D., QUIGLEY, T.W.: Lipoproteinlipase of chicken adipose tissue.
J. biol. Chem., 226, 833-839 (1957).
115. KRAUPP, O.: Der Mechanismus der Klärwirkung des Heparins.
Wien. klin. Wschr., 68, 937-941 (1956).
116. KRAUPP, O., SAILER, S., STUMPF, Ch.: Kinetik und Substratabhängigkeit der Trioleinspaltung im Rattenplasma nach Heparinverabreichung.
Biochem. Z., 328, 301-308 (1956).

117. KRAUPP, O.: Lipoproteinlipase and its methods of determination.
Bibl. haemat. (Basel), 15, 1-8 (1963).
118. KUO, P.T., JOYNER, C.R. jr., REINHOLD, J.G.: effects of fat ingestion and heparin administration on serum lipids of "normal" hypercholesterolemic, hyperlipemic and atherosclerotic subjects.
Amer. J. med. Sci., 232, 613-623 (1956).
119. KUO, P.T., JOYNER, C.R. jr.: Effect of heparin on lipemia-induced angina pectoris.
J. Amer. med. Ass., 163, 727-731 (1957).
120. LABORIT, H., DELGA, J., BAYLON, H., HUGENOT, R., DECHEN, J.: La thérapeutique "Heparin-Lipocaic" par administration sublinguale.
Presse med., 62, 79-81 (1954).
121. LE BRETON, E., FRAYSSINET, Ch., MAY, P.: Phénomènes de clarification et de lipolyse d'un plasma lipémique par le plasma de rat hépariné.
Bull. schweiz. Akad. med. Vol. 13, Fasc., 1-4 (1957).
122. LEUPOLD, F.: Transport der Fettsäuren im Blut.
Med. u. Ernährung, 10, 215-218 (1960).
123. LEUTHARDT, F.: Lehrbuch der Physiologischen Chemie.
Walter de Gruyter u. Co. Berlin, 1957,
S. 39, S. 348 ff.
124. LEVER, W.F., SMITH, P.A., HURLEY, N.A.: Idiopathic hyperlipemia and primary hypercholesterolemia xanthomatosis. Effects of intravenously administered heparin on plasma proteins and lipids.
J. invest. Derm., 22, 71-87 (1954).
125. LEVY, S.W.: Heparin and blood lipids.
Rev. canad. Biol., 17, 1-61 (1958).
126. LINDGREN, F.T., ELLIOT, H.A., GOFMAN, J.W.: The ultracentrifugal characterisation and isolation of human blood lipids and lipoproteins with applications to the study of atherosclerosis.
J. Physic. colloid. Chem., 55, 80-93 (1951).
127. LINDGREN, F.T., FREEMAN, N. K., GRAHAM, D.M.: In vitro lipoprotein transformations.
Circulation, 6, 474-475 (1952).
128. LITWINS, J., VORZIMER, J.J., SUSSMAN, L.N., APPLEZWEIG, N. and ETESS, A.D.: Sublingual administration of heparin.
Proc. Soc. exper. Biol. (N.Y.), 77, 325 (1951).

129. LORENZINI, R., INNOCENTI, E., MORINI, C.: Sulla eparino-
terapia perlinguale.
Minerva med., Torino, 48, 2720-2723 (1957).
130. MARTRIRANI, J., MELO, E.H., HÖXTER, G., WAJCHENBERG, B.L.,
CINTRA, A.B.: Heparin induced clearing
factor: comparative studies between normal
controls and patients with electrocardio-
graphic signs of past myocardial infarction
(coronary heart disease).
Metabolism, 11, 1210-1220 (1962).
131. MATRAS, A.: Hyperlipämische Xanthomatosen und ihre
Behandlung mit Heparin.
Arch. klin. exp. Derm., 203, 503-518 (1956).
134. MCDEVITT, E., HUEBNER, R.D., WRIGHT, J.S.: Ineffectiveness
of heparin by sublingual administration.
J.Amer. med. Ass., 148, 1123-1124 (1952).
135. MCDOWELL, M.F. LITTLE, A., SHANOFF, H.M.: Lipemia clearing
factor activity in coronary heart disease.
Circulation, 18, 495-496 (1958).
136. MENG, H.C., DAVIS, W.S.: Effects of heparin on the
development of atherosclerosis and on
fatty liver in cholesterol-fed rabbits.
Circulation, 10, 590-591 (1954).
137. MENG, H.C., HOLLETT, C., COLE, W.E.: Some factors affecting
the clearing of neutral fat emulsion by
post-heparin plasma.
Amer. J. Physiol., 179, 314-318 (1954).
138. MENG, H.C., EDGREN, B.: Source of plasma free fatty acids
in dogs receiving fat emulsion and heparin.
Amer. J. Physiol., 204, 691-695 (1963).
139. NAKATANI, M., NAKAMURA, M., TORII, S.: A study of lipo-
protein lipase produced by perfusion of
isolated rabbit heart with heparin.
Proc. Soc. exp. Biol., (N.Y.), 107,
853-856 (1961).
140. NICHOLS, A.V., FREEMAN, N.K., SHORE, B., RUBIN, L.:
The interaction of "heparin active factor"
and lipoproteins.
Circulation, 6, 457-458 (1952).
141. NICHOL, E.ST., KEYES, J.N., BORG, J.F., COOGAN, Th.J.,
BOEHRER, J.J., MULLINS, W.L., SCOTT, Th.,
PAGE, R., GRIFFITH, G.C., MASSIE, E.:
Long-term anticoagulant therapy in coronary
atherosclerosis.
Amer. Heart, J., 55, 142-152 (1958).

142. NIKKILÄ, E.H., MAJANEN, S.: The blood heparinoid substances in human atherosclerosis.
Scand. J. clin. Lab. Invest., 4, 204-210 (1952).
143. NIKKILÄ, E.H., MAJANEN, S.: Studies on the lipid-protein relationship in normal and pathological sera and the effect of heparin on serum lipoproteins.
Scand. J. clin. Invest., 5, Suppl. 8 (1953).
144. NIKKILÄ, E.H., GRÄSBECK, R.: Heparin in lipoid nephrosis.
Acta med. scand., 150, 39-46 (1954).
145. PFLEGER, L., TIRSCHKE, H.: Xanthomathose bei idiopathischer Hyperlipämie und Pankreatitis.
Wien. klin. Wschr., 68, 435-438 (1956).
146. PIERCE, F.T.jr.: The introconversion of serum lipoproteins in vivo.
Metabolism, 3, 142-153 (1954).
147. PIERCE, F.T., GOFMAN, J.W.: Lipoproteins, liver disease and atherosclerosis.
Circulation, 4, 25-28 (1951).
148. PILGERAM, L.O., ROSE, L.C.: Partial characterisation of a lipemia clearing defect in atherosclerosis.
Circulation, 14, 502 (1956).
-503
149. REBER, K., STUDER, A.: Acceleration of the gastrointestinal absorption of heparin by Ca-binding substances.
Experienta (Basel), 19, 141-142 (1963).
150. REFN, J., RAASCHOU, F.: Question of sublingual administration of heparin.
Nord. med., 47, 159 (1952).
151. REGAN, T.J., BINAK, K., GORDON, S., V. de FAZIO, HELLEMS, H.K.: Myocardial blood flow and oxygen consumption during postprandial lipemia and heparin-induced lipolysis.
Circulation, 23, 55-63 (1961).
152. REISER, R., WILLIAMS, M.C., SORRELS, M.F.: The transport and dynamic state of exogenous glycerol- and palmitic-acid-labeled tripalmitin.
J. Lipid Res., 1, 241-247 (1960).
153. REMY, D.: Die Mastocytose.
Dtsch. med. Wschr., 82, 719-722 (1957).
154. ROBINSON, D.S., FRENCH, J.E.: The role of albumin in the interaction of chyle and plasma in the rat.
Quart. J. exp. Physiol., 38, 233-239 (1953).

155. ROBINSON, D.S., JEFFRIES, G.H., POOLE, J.C.F.: Further studies on the interaction of the chyle and plasma in the rat.
Quart. J. exp. Phys., 40, 297-308 (1955).
156. ROBINSON, D.S., HARRIS, P.M.: The production of lipolytic activity in the circulation of the hind limb in response to heparin.
Quart. J. exp. Phys., 44, 80-90 (1959).
157. ROBINSON, D.S.: The heparin clearing reaction.
Amer. J. clin. Nutr., 8, 7-20 (1960).
158. RODBELL, M.: Localisation of lipoprotein lipase in fat cells of rat adipose tissue.
J. biol. Chem., 239, 753-755 (1964).
159. SANDHOFER, F., SAILER, S., BRAUNSTEINER, H.: Untersuchungen über endogene Lipoproteidlipaseaktivität.
Klin. Wschr., 40, 855 (1962).
160. SANDHOFER, F., SAILER, S., BRAUNSTEINER, H.: Endogene Lipoproteidlipase-Aktivität im Plasma.
Bibl. haemat. (Basel), 15, 63-69 (1963).
161. SAILER, S., SANDHOFER, F., BRAUNSTEINER, H.: Untersuchungen über die Lipoproteidlipase. I. Mitteilung: Bestimmung der Post-heparin-Lipoproteinlipase ("Klärfaktor") beim Menschen durch Messung der Triglyceridspaltung.
Klin. Wschr., 11, 585-588 (1961).
162. SAILER, S.: Diskussionsbeitrag auf dem Symposium über Lipoproteidlipase Wien 1962.
Bibl. haemat. (Basel), 15, 42 (1963).
163. SAILER, S., SANDHOFER, F., BRAUNSTEINER, H.: Lipoproteidlipase im menschlichen Herzmuskel.
Bibl. haemat. (Basel), 15, 59-62 (1963).
164. SCARDIGLI, G., SALVINI, L., ARADAS, A.: L'absorption de l'heparin par voie sublinguale.
Presse méd., 56, 1140-1141 (1955).
165. SEIFTER, J., BAEDER, D.H.: Lipemia clearing by hyaluronidase, hyaluronate and desoxycorticosterone and its inhibition by cortisone, stress and nephrosis.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.), 86, 709-713 (1954).
166. SEITZ, W., ZÖLLNER, N.: Heparin und Lipämie.
Medizinische, 955-957 (1955).
167. SHAFTEL, H., SELMAN, D.: The effect of sublingual heparin on hyperlipemic serum.
Angiology, 10, 131-133 (1959).

168. SHELLEY, W.B., JUHLIN, L.: Degranulation of the basophil in man induced by alimentary lipemia.
Amer. J. M. Sc., 242, 211-222 (1961)
169. SHORE, B., NICHOLS, A.V., FREEMAN, N.K.: Evidence for lipolytic action by human plasma obtained after intravenous administration of heparin.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.), 83, 216-220, (1953).
170. SHORE, B.: Heparin-activated enzym system of human plasma.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.), 88, 73-75 (1955).
171. SIMON, E.P., WRIGHT, I.S.: Controlled ergometric studies of effect of heparin on intermittent claudication.
J.Amer. med. Ass., 153, 98-102 (1953).
172. SCHETTLER, G., JOBST, H.: Die Bedeutung alimentärer Fettbelastungen für die Diagnose der Arteriosklerose.
Dtsch. med. Wschr., 80, 1077-1081 (1955).
173. SCHETTLER, G., EGGSTEIN, M., DIETRICH, F., JOBST, H.: Zur Bestimmung der Serumlipoproteide mit der Zonenelektrophorese im Stärkemedium.
Klin. Wschr., 35, 268-275 (1955).
174. SCHETTLER, G., EGGSTEIN, M., JOBST, H.: Die essentielle Hyperlipämie.
Dtsch. med. Wschr., 83, 1-12 (1958).
175. SCHETTLER, G.: Arteriosklerose.
G. Thieme Verlag, Stuttgart 1961.
176. SCHETTLER, G.: Die klinische Bedeutung der Lipoproteidlipase.
Bibl. haemat. (Basel), 15, 106-126 (1963).
177. SCHETTLER, G.: Diskussionsbeitrag auf dem Symposium über Lipoproteidlipase Wien 1962.
Bibl. haemat. (Basel), 15, 38 (1963).
178. SCHÖLL, H., SCHETTLER, G.: Heparinklärfaktor und Lipoidstoffwechsel.
Dtsch. med. Wschr., 1405-1410 (1957).
179. SCHÖLL, H., SCHETTLER, G.: Die Lipoproteidlipase und ihre klinische Bedeutung.
Ergeb. inn. Med. Kinderheilk., 16, 245-291 (1961).
180. SCHÖLL, H.: The clearing factor and atherosclerosis.
J. Atheroscler. Res., 2, 242-251 (1962).

181. SCHOLL, H.: Optische Methoden für die Klärfaktorbestimmung.
Bibl. haemat. (Basel), 15, 16-24 (1963).
182. SCHOLL, H., KOPITZKI, F.: Antilipämische Wirkung von
saurem Na-Heparin bei sublingualer oder
rektaler Verabreichung.
Klin. Wschr., 14, 699-706 (1964).
183. SCHÖN, H., DEGENER, U.: Untersuchungen über die Häufig-
keit der Klärinsuffizienz.
Münch. med. Wschr., 104, 1704-1707 (1962).
184. SCHON, H., BRAUNE, P.: Der Einfluß von sublingual ver-
abreichtem Na-Heparin auf den Fett-Transport.
Arzneimittel-Forsch., 13, 464-467 (1963).
185. SCHÖN, H., BERG, G., WIEDMANN, C.: Untersuchungen über
die medikamentöse Beeinflussbarkeit der hyper-
lipämischen Atherosklerose.
Med. u. Ernährung, 4, 233-235 (1963).
186. SCHÖN, H., SAUER, M.: Lipolytische Aktivität einiger
antiatherosklerotischer Medikamente.
Arzneimittel-Forsch., 13, 718-722 (1963).
187. SCHULER, W., MÜLLER, G., MAIER, F.: Lipämieklärung in
vivo ohne clearing-factor.
Schweizer med. Wschr., 87, 787-790 (1957).
188. SPITZER, J.A., SPITZER, J.J.: Effect of liver on lipolysis
by normal and post-heparin sera in the rat.
Amer. J. Physiol., 185, 18-22 (1956).
189. STARK, H.: Über die Wirkung des Heparins bei der Behand-
lung von atherosklerotisch bedingten Fovea-
prozessen.
Klin. Mbl. Augenh., 131, 165-178 (1957).
190. STORK, A., KUCEROVÁ, I.: Die Klärungsfähigkeit des Blut-
plasma und Veränderungen des Plasmacholesterin-
spiegels nach i.v. Heparininjektion bei
Diabetikern und Atherosklerotikern.
Dtsch. med. Wschr., 35, 1410-1413 (1957).
191. SWANK, R.L.: Changes in blood produced by a fat meal and
by intravenous heparin.
Amer. J. Physiol., 164, 798-811 (1951).
192. SWANK, R.L., WILMOT, V.: Chylomicria: Their composition
and their fate after intravenous injection
of small amounts of heparin.
Amer. J. Physiol., 167, 403-412 (1951).
193. SZABÓ, R., TÉNYI, M., VARGA, L.: The influence of nutritive
factors on the clearing activity of the
heart extracts of rats.
Med. exp. (Basel), 7, 363-367 (1962).

194. TERESI, J.D., LUCK, J.M.: The combination of organic anions with serum albumin.
J. biol. Chem.: 194, 823-833 (1952).
195. THURNHERR, A., NIEDERBERGER, W.: Neuere Auffassung über Ätiologie und Therapie der Atherosklerose unter besonderer Berücksichtigung von Heparin.
Schweiz. med. Wschr., 84, 285-290 (1954).
196. TRENCKMANN, H.: Idiopathische Hyperlipämie mit coronaren und peripheren Durchblutungsstörungen.
Ärzt. Wschr., 11, 423-428 (1956).
197. WALDRON, J.M., FRIEDMAN, M.H.F.: The relationship between anticoagulants and lipemia.
Fed. Proc., 7, 130 (1948).
198. WELD, C.B.: Alimentary lipemia and heparin.
Canad. med. Ass. J., 51, 578 (1944).
199. WINDSOR, E., CRONHEIM, G.E.: Gastro-intestinal absorption of heparin and synthetic heparinoids.
Nature (Lond.), 190, 263-264 (1961).
200. WOLDOW, A., CHAPMAN, J.E., EVANS, J.M.: Fat tolerance in subjects with atherosclerosis; heparin effects upon lipemia, lipoproteins and gamma globulin.
Amer. Heart J., 47, 568-579 (1954).
201. ZINN, W.J., FIELD, J.B., GRIFFITH, G.C.: Effect of heparin and treburon in postprandial hyperlipemia.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.), 80, 276-278 (1952).
202. ZÖLLNER, N., SCHENK, R., MAMMEUSEL, L.: Veränderung des Dispersionsgrades der Plasmalipoide durch Heparin.
Naturwissenschaften, 39, 111-112 (1952).
203. ZOLLNER, N., ROTHMUND, E., SEITZ, W.: Ein antilipämisches, nicht gerinnungshemmendes Abbauprodukt des Heparins.
Klin. Wschr., 32, 1096-1097 (1954).
204. ZÖLLNER, N., FRINGS, H.D.: Über den Einfluß von Heparin auf die Verwertung von Nahrungsfett.
Z. ges. exp. Med., 127, 578-586 (1956).
205. ZÖLLNER, N.: Die Bedeutung des Lipämieklärfaktors.
Medizin und Ernährung, 25-30 (1961).
206. ZÖLLNER, N.: Über den Wirkungsmechanismus von Heparin bzw. Heparin-Klärfaktors in der Fettverwertung.
Bibl. haemat. (N.Y.), 15, 45-58 (1963).

Für die Überlassung des Themas dieser Dissertation sowie die guten Arbeitsmöglichkeiten danke ich Herrn Professor Schettler sehr.

Dem Leiter des Labors, Herrn Prov.Do. Dr. H. Wagener gilt mein besonderer Dank für die vielfach gewährten wissenschaftlichen und technischen Ratschläge bei der Durchführung dieser Arbeit.

Den med.-techn. Assistentinnen des damaligen Fettlabors sowie den Ärzten und Schwestern der II. Medizinischen Klinik der Freien Universität Berlin sowie den freiwilligen Probanden danke ich für ihr Entgegenkommen und ihre Unterstützung bei der Durchführung der Untersuchungen.

Lebenslauf

Am 3. 1. 1937 wurde ich als Sohn des Kaufmanns Wolfgang Bergemann und seiner Ehefrau Hilde, geb. Schön, in Berlin geboren.

Nach 12 Jahren Grund- und Oberschule bestand ich am 7. Juni 1955 die Reifeprüfung in Berlin-Friedrichshagen und anschließend die westdeutsche Ergänzungsprüfung am 30. 10. 1955 in Rotenburg/Hannover. Nach anfänglichem Studium der Veterinärmedizin in Hannover bestand ich dort nach drei Semestern das Vorphysikum und nach dem Wechsel zur Humanmedizin nach weiteren drei Semestern an der Universität Erlangen die ärztliche Vorprüfung.

Nach sechs klinischen Semestern in Wien und Berlin legte ich an der Freien Universität am 1. 11. 1962 das medizinische Staatsexamen ab. Während der anschließenden medizinalassistentenzeit konnte ich die Untersuchungen zu der vorliegenden Dissertation durchführen.

Am 10. 3. 1964 heiratete ich die Krankenschwester Christa Trompa; wir haben zwei Kinder, Jan und Tana, 3 bzw. 1 Jahr alt.

Seit dem 16. 8. 1966 kann ich an der II. Medizinischen Klinik der Freien Universität (Direktor Prof. Dr. med. M. Schwab) auf dem Gebiet der Gastroenterologie arbeiten.

